

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Biologie  
Imunologie



Bc. Kristýna Ilievová

**Role protein tyrozin fosfatázy CD45 a kináz rodiny Src v myším modelu  
chronické autoinflamatorní osteomyelitidy**

The Role of Protein Tyrosine Phosphatase CD45 and Src-family Kinases in Murine  
Model of Chronic Autoinflammatory Osteomyelitis

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. června 2020

Podpis:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Brdičkovi, Ph. D. za odborné vedení při vypracovávání diplomové práce, trpělivost, cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jarmile Králové, Ph.D., která mi v začátcích vypracovávání této práce dělala průvodce a pomáhala při fenotypových analýzách, a také ostatním členům Laboratoře leukocytární signalizace a Laboratoře hematonekologie za milý kolektiv, příjemné pracovní prostředí a pomoc při experimentech, kdykoliv to bylo potřeba. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině, příteli a kamarádům za velkou podporu a motivaci při studiu a vypracovávání diplomové práce.

# Abstrakt

K rozvoji autoinflamatorních onemocnění dochází v důsledku dysregulace mechanismů přirozené imunity. To vede ke spontánnímu rozvoji zánětu. Ztráta exprese proteinu PSTPIP2 vede u myši k rozvoji chronické autoinflamatorní osteomyelitidy v důsledku vyšší aktivity neutrofilních granulocytů a jejich zvýšené produkce IL-1 $\beta$ . PSTPIP2 interaguje s PEST fosfatázami a kinázou CSK. Tyto proteiny jsou důležitými negativními regulátory kináz rodiny Src. Tato diplomová práce se věnuje studiu role kináz rodiny Src a jejich pozitivního regulátoru, fosfatázy CD45, v rozvoji chronické autoinflamatorní osteomyelitidy. K tomu byl využit myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy (CMO) deficientní v expresi CD45. U těchto myši dochází k pozdějšímu rozvoji onemocnění. Buňky kostní dřeně izolované z těchto myši po aktivaci silikou produkují méně IL-1 $\beta$  a mají nižší fosforylaci MAP kinázy ERK pravděpodobně v důsledku vyšší fosforylace inhibičního tyrozinu kináz rodiny Src, která vede k jejich nižší aktivitě. U těchto myši bylo též sledováno zastoupení různých typů imunitních buněk v kostní dřeni, slezině a krvi. Výsledky této práce přispívají k lepšímu pochopení role kináz rodiny Src a fosfatázy CD45 v rozvoji chronické autoinflamatorní osteomyelitidy.

## Klíčová slova

CD45, chronická autoinflamatorní osteomyelitida, IL-1 $\beta$ , kinázy rodiny Src, neutrofilní granulocyty, PSTPIP2

# **Abstract**

The development of autoinflammatory diseases is caused by the dysregulation of innate immune mechanisms. This leads to the development of spontaneous inflammation. Mice lacking adaptor protein PSTPIP2 develop chronic autoinflammatory osteomyelitis due to higher activity of neutrophil granulocytes and their increased production of IL-1 $\beta$ . PSTPIP2 interacts with PEST phosphatases and kinase CSK. These proteins are important negative regulators of Src family kinases. In this diploma thesis, the role of Src family kinases and the role of their positive regulator phosphatase CD45 in the development of chronic autoinflammatory osteomyelitis was studied. For this purpose, a mouse model of chronic autoinflammatory osteomyelitis (CMO) lacking CD45 was used. These mice develop the disease with delayed kinetics. Bone marrow cells isolated from these mice produce less IL-1 $\beta$  upon silica activation and have lower phosphorylation of ERK MAP kinase. It is probably caused by higher phosphorylation of the inhibitory tyrosine of Src family kinases resulting in their lower activity. The presence of different immune cell populations in the bone marrow, spleen and blood of these mice was also monitored in these mice. The results of this work contribute to a better understanding of the role of Src family kinases and phosphatase CD45 in the development of chronic autoinflammatory osteomyelitis.

# **Keywords**

CD45, chronic autoinflammatory osteomyelitis, IL-1 $\beta$ , Src family kinases, neutrophil granulocytes, PSTPIP2

# Obsah

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>Přehled literatury</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1      | Autoinflamatorní onemocnění . . . . .                                      | 9         |
| 2.1.1    | Produkce interleukinu-1 $\beta$ . . . . .                                  | 9         |
| 2.2      | Myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy . . . . .             | 10        |
| 2.3      | PSTPIP2 . . . . .  | 12        |
| 2.4      | Kinázy rodiny Src . . . . .  | 13        |
| 2.4.1    | Struktura a regulace aktivity kináz rodiny Src . . . . .                   | 13        |
| 2.4.2    | Kinázy rodiny Src v neutrofilních granulocytech . . . . .                  | 15        |
| 2.4.3    | Kinázy rodiny Src v autoinflamatorních onemocněních . . . . .              | 15        |
| 2.5      | Protein tyrozin fosfatáza CD45 . . . . .                                   | 16        |
| 2.6      | Myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy s deficiencí CD45 . . | 18        |
| <b>3</b> | <b>Cíle práce</b>  | <b>20</b> |
| <b>4</b> | <b>Materiály a metody</b>  | <b>21</b> |
| 4.1      | Materiály . . . . .  | 21        |
| 4.1.1    | Chemikálie . . . . .   | 21        |
| 4.1.2    | Roztoky . . . . .  | 22        |
| 4.1.3    | Média . . . . .  | 23        |
| 4.1.4    | Myší modely . . . . .  | 23        |
| 4.1.5    | Protilátky . . . . .   | 24        |
| 4.1.6    | Komerční soupravy . . . . .  | 25        |
| 4.1.7    | Další materiály . . . . .  | 26        |
| 4.1.8    | Vybavení laboratoře . . . . .  | 26        |
| 4.2      | Metody . . . . .   | 29        |
| 4.2.1    | Izolace buněk krve . . . . .   | 29        |
| 4.2.2    | Izolace buněk sleziny . . . . .  | 29        |
| 4.2.3    | Izolace buněk kostní dřeně . . . . .                                       | 29        |
| 4.2.4    | Purifikace granulocytů . . . . .   | 29        |
| 4.2.5    | Fluorescenční průtoková cytometrie . . . . .                               | 31        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.2.6    | Značení buněk pro průtokovou cytometrii . . . . .                | 31        |
| 4.2.7    | Aktivace buněk silikou . . . . .                                 | 33        |
| 4.2.8    | Aktivace buněk pro detekci štěpení IL-1 $\beta$ . . . . .        | 33        |
| 4.2.9    | Příprava vzorků na SDS PAGE . . . . .                            | 33        |
| 4.2.10   | SDS PAGE . . . . .   | 34        |
| 4.2.11   | Western blot . . . . .   | 35        |
| 4.2.12   | Imunodetekce proteinů imobilizovaných na PVDF membráně . . . . . | 35        |
| 4.3      | Analýza dat . . . . .  | 36        |
| 4.3.1    | Analýza dat z průtokové cytometrie . . . . .                     | 36        |
| 4.3.2    | Analýza western blotů . . . . .                                  | 36        |
| 4.3.3    | Statistická analýza dat . . . . .                                | 36        |
| <b>5</b> | <b>Výsledky</b>  | <b>38</b> |
| 5.1      | Zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk . . . . .          | 38        |
| 5.1.1    | Kostní dřev . . . . .  | 38        |
| 5.1.2    | Slezina . . . . .  | 42        |
| 5.1.3    | Krev . . . . .   | 44        |
| 5.2      | Fosforylace kináz rodiny Src . . . . .                           | 45        |
| 5.2.1    | Inhibiční tyrozin . . . . .                                      | 45        |
| 5.2.2    | Aktivační tyrozin . . . . .                                      | 47        |
| 5.3      | Vybrané signální dráhy deregulované u CMO myši . . . . .         | 51        |
| 5.3.1    | Fosforylace MAP kinázy ERK . . . . .                             | 51        |
| 5.3.2    | Produkce IL-1 $\beta$ . . . . .                                  | 53        |
| <b>6</b> | <b>Diskuze</b>   | <b>55</b> |
| <b>7</b> | <b>Závěr</b>   | <b>61</b> |
|          | <b>Literatura</b>  | <b>63</b> |

## Seznam zkratek

|            |   |
|------------|---|
| AKT        | protein kináza B  |
| APC        | allofykocyanin  |
| APS        | persíran amonný   |
| ASC        | speck-like protein obsahující CARD doménu asociovaný s apoptózou      |
| AV         | Akademie věd  |
| B220       | izoforma CD45 exprimovaná u B-lymfocytů                               |
| BIOCEV     | Biotechnologické a biomedicínské centrum výzkumu                      |
| BLK        | kináza rodiny Src   |
| BSA        | bovinní sérový albumin  |
| CCP        | České centrum pro fenogenomiku  |
| CD         | diferenciační klastr  |
| CD45KO     | CD45 deficientní myší model   |
| CMO        | myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy                  |
| CMO CD45KO | CD45 deficientní myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy |
| CMP        | společný progenitor myeloidních buněk                                 |
| CRMO       | chronická rekurentní multifokální osteomyelitida                      |
| CSK        | kináza fosforylující C-koncový tyrozin kináz rodiny Src               |
| CT         | výpočetní tomografie  |
| DIRA       | deficience antagonisty IL-1 receptoru                                 |
| DNA        | deoxyribonukleová kyselina  |
| DTT        | dithiotreitol   |
| EDTA       | kyselina etylendiamintetraoctová                                      |
| ERK        | extracelulárně regulovaná kináza                                      |
| FBS        | fetální bovinní sérum   |
| FGR        | kináza rodiny Src   |
| FITC       | fluorescein izothiokyanát   |
| FMF        | familiární středomořská horečka                                       |
| fMLP       | formyl-metionylleucylfenylalanin                                      |
| FYN        | kináza rodiny Src   |



|                |   |
|----------------|---|
| G-CSF          | faktor stimulující kolonie granulocytů  |
| GMP            | společný progenitor granulocytů a makrofágů   |
| HCK            | kináza rodiny Src   |
| I- $\kappa$ B  | inhibitor $\kappa$ B  |
| IL-1 $\alpha$  | interleukin 1 $\alpha$  |
| IL-1 $\beta$   | interleukin 1 $\beta$   |
| IL-1R          | receptor pro interleukin 1  |
| IL-6           | interleukin 6   |
| ITAM           | aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrozinu   |
| JAK kináza     | Janova kináza   |
| kDa            | kilodalton  |
| LCK            | kináza rodiny Src   |
| LPS            | lipopolysacharid  |
| LSK            | kmenové buňky a časně progenitory neexprimující povrchové molekuly charakteristické pro různé buněčné typy a exprimující molekuly CD117 a Sca-1 |
| LYN            | kináza rodiny Src   |
| MAP kináza     | mitogeny aktivovaná protein kináza  |
| M-CSF          | faktor stimulující kolonie makrofágů  |
| MEP            | společný progenitor megakaryocytů a erytrocytů  |
| MIP-1 $\alpha$ | chemotaktický faktor 1 $\alpha$ pro monocyty  |
| NF- $\kappa$ B | nekrotizující faktor $\kappa$ B   |
| NLR            | Nod-like receptor   |
| NLRP3          | komplex proteinů tvořících inflamazom   |
| p38            | člen rodiny kináz aktivovaných mitogenem  |
| PAPA           | onemocnění s těmito projevy: pyogenní artritida, pyoderma gangrenosum, akné   |
| PB             | pacifická modrá   |
| PBS            | fosfátový pufr  |
| PE             | fykoerytrin   |
| PE-Cy7         | konjugát fykoerytrinu   |
| PEST fosfatázy | prolin, glutamát, serin a treonin bohaté fosfatázy  |

|                    |   |
|--------------------|---|
| PCH                | Pombe Cdc15 homolog   |
| PP2                | inhibitor kináz rodiny Src                                    |
| pro-IL-1 $\beta$   | prekurzor interleukinu 1 $\beta$                              |
| PRR                | receptor rozeznávající molekulární vzory                      |
| Ptp <sup>src</sup> | receptorová protein tyrozin fosfatáza typu C                  |
| PVDF               | polyvinylidenfluorid  |
| ROS                | reaktivní kyslíkové intermediáty                              |
| SDS                | dodecylsírán sodný  |
| SDS PAGE           | polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným |
| SFK                | kinázy rodiny Src   |
| SH2 doména         | homologická doména 2 kináz rodiny Src                         |
| SH3 doména         | homologická doména 3 kináz rodiny Src                         |
| SHIP-1             | inozitol-5-polyfosfát fosfatáza obsahující SH2 doménu         |
| SRC                | kináza rodiny Src   |
| SYK                | slezinná tyrozin kináza                                       |
| TEMED              | tetrametyletylendiamin  |
| TNF- $\alpha$      | faktor $\alpha$ nekrotizující nádory                          |
| ÚMG                | Ústav molekulární genetiky                                    |
| WT                 | myší model divokého kmene                                     |
| YES                | kináza rodiny Src   |

# 1 Úvod

Přesná regulace imunitní odpovědi je důležitá pro odpovídající obranu proti patogenům a udržení vnitřní homeostázy organismu. V důsledku dysregulace imunitních mechanismů může na jedné straně dojít k nedostatečné obraně proti patogenům a na straně druhé k rozvoji autoinflamatorních či autoimunitních onemocnění. Autoinflamatorní onemocnění jsou způsobená nedostatečnou regulací přirozené imunity. V důsledku toho dochází bez zjevné příčiny k rozvoji zánětu a poškození tkání. Etiologie těchto onemocnění často není zcela známa.

Takovým onemocněním je i chronická rekurentní multifokální osteomyelitida projevující se sterilním zánětem kostí, kloubů a okolních tkání. U myši dochází k rozvoji podobných příznaků v důsledku ztráty exprese adaptorového proteinu PSTPIP2 [1, 2]. Ačkoliv dosud nebyl nalezen pacient s mutací PSTPIP2, studium myšího modelu chronické autoinflamatorní osteomyelitidy (CMO) je důležité pro lepší porozumění regulaci zánětu a odhalení buněčných procesů a signálních drah, které jsou u autoinflamatorních onemocnění deregulovány.

Tato diplomová práce se věnuje studiu role kináz rodiny Src (SFK) a jejich pozitivního regulátoru, fosfatázy CD45, v rozvoji chronické autoinflamatorní osteomyelitidy. PSTPIP2 totiž interaguje s PEST fosfatázami a kinázou CSK [3, 4], které jsou důležitými negativními regulátory SFK [5, 6]. Ztráta exprese PSTPIP2 a tím i ztráta jeho interakce s PEST fosfatázami a CSK by mohla vést k deregulaci aktivity SFK. Ke studiu této problematiky byl použit CMO model deficientní v expresi CD45 a dále také inhibitor SFK – PP2 [7].

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Autoinflamatorní onemocnění

Autoinflamatorní onemocnění se vyznačují zdánlivě bezdůvodným rozvojem horečky a zánětu bez přítomnosti patogenního agens. Dochází k tomu v důsledku deregulace přirozené imunity. Adaptivní imunitní mechanismy jsou do rozvoje a průběhu těchto onemocnění zapojeny jen omezeně. Často u těchto onemocnění dochází k epizodickému střídání období horečky a zánětu s obdobími klidu. Zánět může být systémový nebo lokalizovaný. Často zasahuje kosti, klouby, svaly, kůži nebo gastrointestinální trakt a další orgány. Ačkoliv jsou projevy i příčiny rozvoje jednotlivých onemocnění do určité míry rozdílné, většinu z nich spojuje je deregulace produkce prozánětlivých cytokinů, shrnuto v [8, 9].

Část autoinflamatorních onemocnění je způsobena mutací v jednom genu. Monogeně dědičné jsou například PAPA či DIRA syndrom nebo familiární středomořská horečka (FMF) [10, 11, 12, 13]. Jedná se mimo jiné i o geny zapojené do regulace či přímo produkce IL-1 $\beta$ . Je tomu tak i u všech tří výše zmíněných onemocnění. Etiologii některých dalších autoinflamatorních onemocnění, například chronické rekurentní multifokální osteomyelitidy (CRMO), však stále neznáme, shrnuto v [14, 15].

#### 2.1.1 Produkce interleukinu-1 $\beta$

Produkce biologicky aktivní formy IL-1 $\beta$  probíhá ve dvou krocích. Prvním je syntéza neaktivního prekursoru pro-IL-1 $\beta$ , který je ve druhém kroku aktivován proteolytickým štěpením. První krok je typicky spuštěn stimulací receptorů rozeznávajících molekulární vzory (PRR). Štěpení pro-IL-1 $\beta$  na aktivní protein pak většinou zajišťuje multiproteinový komplex zvaný inflamazom. Sestavení a aktivaci inflamazomu iniciují další prozánětlivé nebo stresové signály. Existuje celá řada různých inflamazomů. Nejlépe prostudované jsou inflamazomy tvořené receptory z rodiny Nod-like receptorů (NLR), adaptorovým proteinem ASC a proteázou kaspáza 1 (např. NLRP3 inflamazom), shrnuto v [16].

Ke štěpení IL-1 $\beta$  může docházet i alternativní cestou nezávisle na inflamazomu. Podílí se na něm například kaspáza 8 nebo jiné proteázy [17, 18, 19].

## 2.2 Myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy

Absence nebo snížená exprese adaptorového proteinu PSTPIP2 vede u myší k rozvoji onemocnění označovanému jako chronická autoinflamatorní osteomyelitida, které má řadu společných rysů s lidskou CRMO a některými dalšími onemocněními. Projevuje se jako zánětlivé onemocnění kostí, chrupavek, kloubů a okolních tkání. Existuje několik myších kmenů s deficiencí PSTPIP2. U všech dochází k rozvoji podobných symptomů [2, 20, 21]. Nejvíce byl studován myší kmen označovaný jako CMO, který byl také použit v rámci této diplomové práce. U CMO myší vedla spontánní autozomálně recesivní mutace v PSTPIP2 k aminokyselinové záměně leucinu za prolin na pozici 98 (L98P) [1, 2]. V důsledku této mutace dochází k nestabilitě tohoto proteinu. Ta je natolik výrazná, že PSTPIP2 není v těchto myších na proteinové úrovni vůbec detekovatelný. Ztráta jeho exprese pak vede k rozvoji chronické autoinflamatorní osteomyelitidy [22]. V této části diplomové práce jsou shrnuty dosavadní poznatky o chronické autoinflamatorní osteomyelitidě právě u CMO modelu.

U CMO myší dochází k rozvoji chronického sterilního zánětu kostí, chrupavek, kloubů a okolní tkáně pozorovatelného především v oblasti dolních končetin, ocasu a uší. Tento chronický zánět vede k vyšší aktivitě osteoklastů, destrukci kostní tkáně, která je následně nahrazena fibroblasty, a deformitám [1, 23, 24]. K rozvoji prvních viditelných příznaků onemocnění dochází ve věku 6–8 týdnů [1].

Rozvoj onemocnění je doprovázen vyšší infiltrací postižené tkáně buňkami především přirozené imunity – neutrofilními granulocyty, monocyty a makrofágy [1, 22, 23]. U symptomatických myší byly pozorovány zvětšené uzliny a slezina. Slezina těchto myší byla ve zvýšené míře infiltrována makrofágy a probíhala zde extramedulární krvetvorba [2].

K rozvoji onemocnění dochází nezávisle na buňkách adaptivní imunity [22]. Jedná se tedy o autoinflamatorní onemocnění, nikoliv autoimunitní. Efektorovými buňkami jsou neutrofilní granulocyty. Jejich deplecí lze rozvoj onemocnění zabránit [25]. Jakou roli však v rozvoji onemocnění hrají ostatní myeloidní buňky bylo zatím studováno jen málo.

Neutrofilní granulocyty CMO myší produkují vyšší množství IL-1 $\beta$  důležitého pro rozvoj onemocnění. CMO myši s deficiencí receptoru pro IL-1 (IL-1R) jsou kompletně chráněny před rozvojem onemocnění [26, 27]. Studie využívající CMO myši deficientní v produkci IL-1 $\beta$  přinesly rozdílné výsledky. Jedna ze studií ukázala kompletní ochranu

před rozvojem onemocnění [27], jiná pouze jeho pozdější rozvoj a podstatně mírnější průběh [26]. Shodují se však v tom, že deficeience v produkci IL-1 $\alpha$  nemá na rozvoj onemocnění vliv. Zároveň z obou studií vyplývá, že vyšší produkce IL-1 $\beta$  je u CMO myši důležitým faktorem v rozvoji onemocnění.

Na základě výsledků dřívějších studií bylo předpokládáno, že zvýšená produkce IL-1 $\beta$  u CMO myši je nezávislá na NLRP3 inflamazomu a aktivitě kaspázy 1 a štěpení IL-1 $\beta$  je spuštěno jinou alternativní cestou [26, 27]. K této domněnce přispívala i skutečnost, že při *in vitro* experimentech bylo za přítomnosti inhibitoru serinových proteáz štěpení IL-1 $\beta$  u CMO sníženo [26]. Další studie však ukázaly, že u CMO hraje NLRP3 inflamazom a kaspáza 1 redundantní roli s kaspázou 8. U CMO myši deficientních v NLRP3 či kaspáze 1 a současně také kaspáze 8 nedochází k rozvoji onemocnění [25, 28]. Jakým způsobem je však u CMO kaspáza 8 aktivována a jestli hrají ve štěpení IL-1 $\beta$  u CMO roli serinové proteázy, zůstává neobjasněno.

Zajímavým zjištěním je, že produkce IL-1 $\beta$  i rozvoj a průběh onemocnění mohou být modulovány střevním mikrobiomem. Nicméně není znám přesný mechanismus, který vede k modulaci imunity, ačkoliv je toto téma v poslední době velmi studované. Sami autoři studie také uznávají, že není zcela jasné, jestli změna mikrobiomu předchází rozvoji onemocnění nebo k ní dojde v důsledku onemocnění [25].

Zvýšená aktivita neutrofilních granulocytů a produkce IL-1 $\beta$  vede ke zvýšené produkci dalších cytokinů a chemokinů, např. TNF- $\alpha$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$ , G-CSF a M-CSF [22, 26, 27]. Některé z těchto cytokinů jsou chemotaktické pro prekurzory osteoklastů nebo stimulují aktivitu osteoklastů. To následně vede k destrukci kostní tkáně [24, 29, 30].

Kromě zvýšené produkce cytokinů byla u CMO myši zaznamenána také vyšší produkce reaktivních kyslíkových intermediátů (ROS). Ta je taktéž způsobena vyšší aktivitou neutrofilních granulocytů [31]. Produkce ROS vede k aktivaci osteoklastů [32], proto bylo studováno, jestli u myši, které mají defekt v produkci ROS, dochází k rozvoji onemocnění. Výsledky této studie ukázaly, že ROS jsou nezbytné k destrukci kostí. Nicméně rozvoj zánětu měkkých tkání je na jejich produkci nezávislý [31]. Nezbytným mechanismem vedoucím k destrukci kostí je tedy dysregulovaná produkce ROS neutrofilními granulocyty, která pravděpodobně vede k aktivaci osteoklastů.

U CMO modelu byla též studována aktivace různých signálních drah zapojených do aktivace imunitní odpovědi a rozvoje zánětu. Při experimentech *in vitro* byla u CMO zjiš-

těna zvýšená fosforylace MAP kinázy ERK po aktivaci buněk M-CSF nebo silikou [4, 22]. Zvýšená fosforylace ERK byla též pozorována v lyzátech tlapek symptomatických myší. Stejně tak byla v těchto lyzátech zvýšena fosforylace I- $\kappa$ B naznačující zvýšenou aktivitu NF- $\kappa$ B dráhy [33]. U neutrofilních granulocytů izolovaných z CMO myší byla pozorována zvýšená fosforylace další MAP kinázy p38 po stimulaci Fc-receptorů. Po stimulaci buněk LPS či stimulaci jejich Fc-receptorů dochází u CMO také ke zvýšené fosforylaci kinázy AKT [4]. Výsledky těchto studií ukazují, že u CMO je deregulována celá řada signálních drah. Stále však zůstává neobjasněno, které deregulované dráhy vedou k rozvoji onemocnění a které dráhy jsou deregulované v důsledku aktivace neutrofilů a následné prozánětlivé signalizace.

Na základě dosavadních znalostí o signálních drahách, které jsou u CMO zapojeny do rozvoje onemocnění, bylo nedávno publikováno, že CMO myši s deficiencí kinázy SYK jsou kompletně chráněny před rozvojem onemocnění. Autoři této studie se domnívají, že kináza SYK nereguluje inflamazom, ale pouze produkci pro-IL-1 $\beta$ , prozánětlivou signalizaci NF- $\kappa$ B dráhy a pravděpodobně migraci neutrofilů do místa zánětu [33]. Zůstává však neobjasněn mechanismus, jakým je aktivita kinázy SYK u CMO spuštěna.

Přesný mechanismus, jakým v důsledku absence PSTPIP2 dochází u CMO k rozvoji onemocnění, stále není objasněn. K jeho objasnění je potřeba dalšího studia. Odhalení mechanismů vedoucích k rozvoji tohoto onemocnění a lepší porozumění drahám deregulovaným u CMO myší je důležité pro lepší pochopení regulace zánětu a rozvoje autoinflammatorních onemocnění.

## 2.3 PSTPIP2

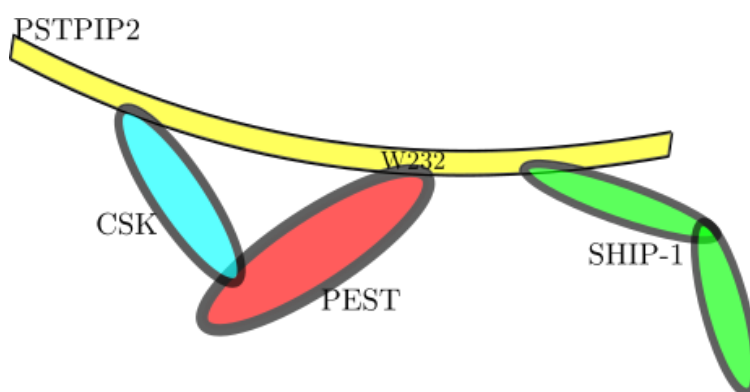
PSTPIP2 je cytoplazmatický adaptorový protein z rodiny PCH (Pombe Cdc15 homology). Je tvořen pouze jedinou doménou – F-BAR doménou, která má zakřivený tvar a zprostředkovává interakci s cytoplazmatickou membránou, shrnuto v [34, 35].

Exprese PSTPIP2 byla prokázána v myeloidních buňkách [4, 22]. Stimulace těchto buněk podněty vyvolávajícími prozánětlivou signalizaci, například LPS, IL-6 nebo TNF- $\alpha$ , vede k navýšení jeho exprese [4, 20, 22]. Dále bylo zjištěno, že PSTPIP2 interaguje s cytoskeletem [3] a reguluje organizaci a formaci filopodií a pohyb makrofágů [36].

Ztráta či snížení exprese PSTPIP2 vede u myší k rozvoji výše popsaného chronického zánětu kostí, chrupavek, kloubů a okolních tkání [2, 20, 21]. PSTPIP2 interaguje s proteiny,

které regulují imunitní odpověď. Jsou to zejména fosfatáza SHIP-1, kináza CSK a PEST fosfatázy [3, 4], viz obrázek 1.

Jedním z důsledků absence PSTPIP2 je pravděpodobně deregulace aktivity CSK a signálních drah, které CSK reguluje. K této teorii přispívá i skutečnost, že u CSK deficientních myší také dochází k rozvoji zánětlivého onemocnění způsobeného zvýšenou aktivitou neutrofilních granulocytů [37]. Přesný mechanismus zapojení interakčních partnerů PSTPIP2 do rozvoje autoinflamatorního onemocnění u myší deficientních v expresi PSTPIP2 však zůstává neobjasněn.



Obrázek 1: **PSTPIP2** se zmíněnými interakčními partnery.

## 2.4 Kinázy rodiny Src

CSK je kritickým regulátorem kináz rodiny Src (SFK). Jde o skupinu nerekceptorových protein tyrozin kináz pojmenovanou po jednom ze zástupců této rodiny – kináze SRC. V hematopoetických buňkách je exprimováno dalších 7 kináz z této rodiny – BLK, FGR, FYN, HCK, LCK, LYN a YES. SFK jsou zapojeny do regulace mnoha buněčných procesů. Přísná regulace jejich aktivity je nezbytná pro správnou signalizaci buněk nejen imunitního systému. Deregulace aktivity SFK, například v důsledku mutace inhibičního tyrozinu, je spojena s deregulací zánětlivé odpovědi a rozvojem nádorových onemocnění, shrnuto v [38, 39, 40].

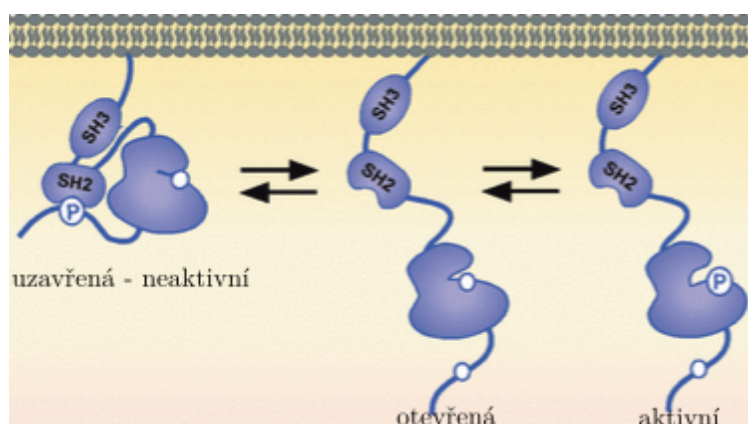
### 2.4.1 Struktura a regulace aktivity kináz rodiny Src

Všechny kinázy rodiny Src mají podobnou strukturu a molekulovou hmotnost (okolo 55 kDa). Liší se především svým N-koncem, který je myristylován a často i palmitylo-



ván. Tyto posttranslační modifikace umožňují ukotvení SFK do membrány. Na N-konec navazuje SH3 a SH2 doména následovaná katalytickou doménou a C-koncovou regulační oblastí.

Aktivita SFK je regulována na základě fosforylace inhibičního tyrozinu v C-koncové oblasti a tyrozinu v aktivační smyčce katalytické domény. V případě fosforylace pouze inhibičního tyrozinu dochází k jeho interakci s SH2 doménou a dalším konformačním změnám. SFK v takovém případě zaujímají neaktivní tzv. uzavřenou konformaci. Defosforylace inhibičního tyrozinu vede k zaujetí tzv. otevřené konformace, která umožňuje následnou trans-fosforylaci aktivačního tyrozinu a plnou aktivaci SFK. Jednotlivé konformace jsou schématicky zobrazeny na obrázku 2. Podrobně je struktura a regulace aktivity SFK popsána v [41].



Obrázek 2: **Konformace kináz rodiny Src.** Převzato z [42] a upraveno.

Některé studie naznačují, že při současné fosforylaci inhibičního i aktivačního tyrozinu jsou SFK stejně enzymaticky aktivní jako v případě fosforylace pouze aktivačního tyrozinu [43, 44]. Je však problematické ověřit, že se skutečně jedná o dvojité fosforylované SFK a ne směs SFK, které mají fosforylovaný buď pouze inhibiční, nebo aktivační tyrozin. Při imunoprecipitacích, které jsou při měření kinázové aktivity SFK používány, navíc dochází k vazbě protilátek na SFK. Tyto navázané protilátky mohou ovlivnit aktivitu SFK a zkreslit výsledky kinázových esejí. Nakolik jsou tedy dvojité fosforylované SFK enzymaticky aktivní zůstává neobjasněno.

K fosforylaci inhibičního tyrozinu dochází v důsledku aktivity kinázy CSK [6]. Proti ní působí fosfatáza CD45, která inhibiční tyrozin SFK defosforyluje [45, 46]. Kináza CD45 je při vysoké expresi v T-lymfocytech, nikoliv však B-lymfocytech, schopna defosforylovat

těž aktivační tyrozin SFK [47, 48]. Jestli má CD45 tuto duální funkci v myeloidních buňkách zůstává neobjasněno.

Aktivitu SFK mohou také regulovat PEST fosfatázy. Ty jsou schopny defosforylovat aktivační tyrozin SFK. Bylo zjištěno, že PEST fosfatázy asociují s CSK. Tento komplex je pak schopen inhibovat SFK současnou defosforylací aktivačního tyrozinu a fosforylací tyrozinu inhibičního [5].

#### **2.4.2 Kinázy rodiny Src v neutrofilních granulocytech**

Expresí kináz FGR, HCK a LYN je do určité míry omezena na myeloidní buňky, shrnuto v [38]. V neutrofilních granulocytech byla proto studována role především těchto SFK. Nicméně jsou v těchto buňkách též exprimovány kinázy SRC a YES. Expresí ostatních SFK je v neutrofilních granulocytech velmi nízká [49].

SFK se v neutrofilních granulocytech podílí na regulaci celé řady procesů vedoucích k přiměřené imunitní odpovědi [50, 51, 52]. Studium této problematiky však komplikuje množství různých kináz exprimovaných v těchto buňkách a částečná redundance jednotlivých SFK. Není proto dosud objasněno, jakým způsobem jsou SFK v neutrofilních granulocytech zapojeny do regulace jednotlivých signálních drah.

#### **2.4.3 Kinázy rodiny Src v autoinflamatorních onemocněních**

Deregulace aktivity kináz rodiny Src může vést k rozvoji autoinflamatorních onemocnění. U myšího modelu s mutací v regulační C-koncové oblasti kinázy HCK (aminokyselinová záměna inhibičního tyrozinu za fenylalanin, která brání zaujetí neaktivní uzavřené konformace a vede tedy ke zvýšené aktivitě této kinázy) docházelo k rozvoji zánětu v plicích. Plice těchto myší byly ve zvýšené míře infiltrovány buňkami především přirozené imunity. Byla též pozorována vyšší produkce TNF- $\alpha$  makrofágy. U neutrofilních granulocytů těchto myší byla zjištěna zvýšená migrace, produkce ROS a degranulace [53].

Mutace v C-koncové oblasti FGR vedoucí k její vyšší aktivitě vedla k rozvoji dalšího zánětlivého onemocnění. U tohoto modelu docházelo k zánětu kostí, kloubů a okolních tkání a v důsledku toho k destrukci kostí [54, 55]. Fenotypem se tedy tento model podobá CMO modelu [2]. Nicméně v případě mutace FGR je produkce IL-1 $\beta$  pouze mírně zvýšena [55]. Mutace v C-koncové oblasti kinázy FGR vedoucí k její zvýšené aktivitě a rozvoji autoinflamatorního onemocnění byla nalezena i u lidí [54].

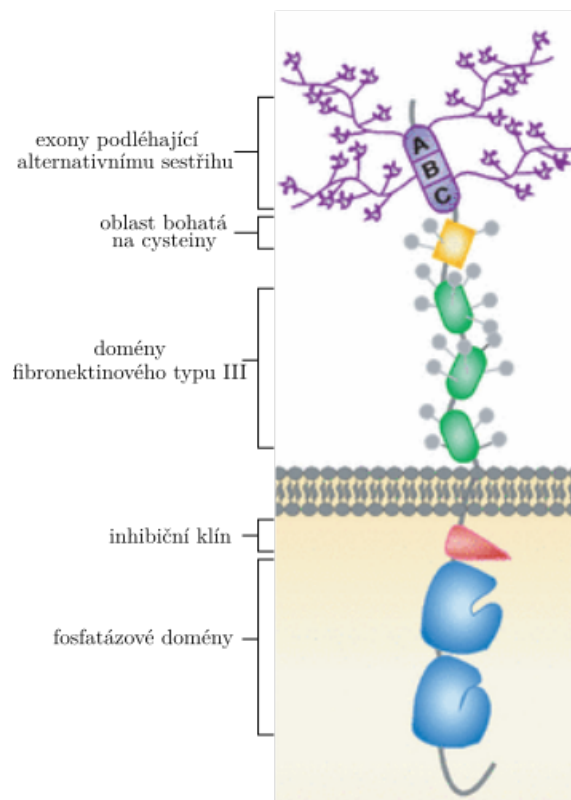
Studie dvou výše zmíněných modelů ukázaly, že zvýšená aktivita kinázy HCK nebo FGR vede k rozvoji odlišných autoinflamatorních onemocnění. Mechanismus rozvoje těchto dvou onemocnění se tedy neznámým způsobem liší, role a aktivita těchto dvou mutantních SFK tedy zřejmě není zcela redundantní.

SFK hrají roli i v modelu protilátkami indukované artritidy. Zde se jedná spíše o autoimunitní onemocnění z důvodu nutného zapojení adaptivní imunity. Nicméně dochází při něm též k rozvoji zánětu a poškození tkáně v důsledku aktivace neutrofilních granulocytů. Bylo ukázáno, že myší model tohoto onemocnění je v případě deficiencie kináz FGR, HCK a LYN chráněn před rozvojem zánětu. Je to způsobeno tím, že nedochází k vytvoření zánětlivého prostředí – produkci prozánětlivých cytokinů a ROS. K rozvoji tohoto onemocnění je tedy nezbytná aktivita SFK [56]. Nebylo však studováno, jestli je aktivita SFK u tohoto onemocnění deregulována nebo jestli dochází k deregulaci některé z drah, které jsou na aktivitě SFK závislé.

## 2.5 Protein tyrozin fosfatáza CD45

CD45 je transmembránová protein tyrozin fosfatáza hojně studovaná pro svou roli v regulaci imunitní odpovědi nejen prostřednictvím regulace aktivity SFK (viz kapitola 2.4.1). Její exprese je omezena výhradně na jaderné hematopoetické buňky. V závislosti na buněčném typu, vývojovém stádiu a aktivaci buněk dochází k expresi různých izoform. Izoformy CD45 se liší svou N-koncovou částí extracelulární domény. Tato N-koncová část CD45 je silně O-glykosylovaná. Navazuje na ni oblast bohatá na cysteiny a tři domény fibronektinového typu III. Celá extracelulární doména je N-glykosylovaná. CD45 jedenkrát prochází membránou a její intracelulární část tvoří tzv. inhibiční klín, který se pravděpodobně účastní regulace aktivity SFK [57], a dvě fosfatázové domény. C-koncová doména je však enzymaticky neaktivní. Struktura CD45 je souhrnně popsána v [58] a schématicky znázorněna na obrázku 3.

Ke studiu role CD45 v regulaci imunitní odpovědi byly nejprve využívány buněčné linie. Studována byla její role především v T- a B-lymfocytech a bylo například zjištěno, že CD45 je nepostradatelná pro signalizaci přes antigenně specifický receptor [46, 59, 60]. Později byly vytvořeny tři myší modely deficientní v expresi CD45 v důsledku různých narušení genu kódujícího CD45 (dále označovány jako CD45KO) [61, 62, 63]. Myší model



Obrázek 3: **Struktura CD45.** Převzato z [42] a upraveno.

deficientní v expresi CD45 v důsledku narušení exonu 9 [62] byl také použit při vypracování této diplomové práce.

U CD45KO myši je zastaven vývoj T-lymfocytů z důvodu ztráty signalizace přes T-receptor. K tomu dochází pravděpodobně v důsledku inhibice kinázy LCK, která má u CD45KO zvýšeně fosforylovaný inhibiční tyrozin [62]. U LCK deficientního myšního modelu je taktéž zastaven vývoj T-lymfocytů [64]. Naproti tomu, exprese LCK s aminokyselinovou záměnou inhibičního tyrozinu za fenylalanin, která vede k zabránění zaujetí neaktivní inhibiční konformace a k vyšší aktivitě této kinázy, u CD45KO vede k normálnímu vývoji T-lymfocytů [65].

Vývoj B-lymfocytů není u CD45KO narušen. Dochází však k navýšení jejich počtu ve slezině a expanzi některých jejich subpopulací [62]. Tento relativně normální vývoj B-lymfocytů ve srovnání s T-lymfocyty je pravděpodobně částečně způsoben redundantní rolí fosfatáz CD45 a CD148 exprimovaných v B-lymfocytech [66]. Dále bylo u CD45KO popsáno zvýšené množství dendritických buněk, které mají narušenou produkci interferonů typu I [67]. Naproti tomu po stimulaci těchto dendritických buněk byla pozorována zvýšená aktivace NF- $\kappa$ B dráhy a zvýšená produkce IL-6 [68].

Deficience CD45 má též vliv na různé funkce neutrofilních granulocytů. V důsledku toho byla u CD45KO pozorována snížená celková obrana proti infekci *S. aureus* [51]. U CD45 deficientních neutrofilních granulocytů stejně jako u CD45 deficientních T- a B-lymfocytů dochází v klidovém stavu k vyšší fosforylaci inhibičního tyrozinu SFK [46, 51, 62]. To naznačuje nižší aktivitu těchto kináz. Tyto neutrofilní granulocyty se vyznačují sníženou adhezí, méně směrovanou chemotaxí, mírně sníženou fagocytózou a nižší produkcí ROS. Po stimulaci fMLP je u nich snížena fosforylace MAP kinázy ERK a kinázy AKT. Nižší fosforylace MAP kinázy ERK a méně směrovaná chemotaxe byla též pozorována u neutrofilních granulocytů deficientních v expresi SFK. Je tedy pravděpodobné, že dysregulace těchto procesů je u CD45 deficientních neutrofilních granulocytů způsobena nižší aktivitou SFK [51].

CD45 se podílí na celé řadě dalších procesů i u dalších typů imunitních buněk. Často pravděpodobně prostřednictvím regulace aktivity SFK. Je například zapojena do regulace adheze makrofágů [69, 70] či degranulace mastocytů [71]. CD45 defosforyluje kromě SFK též například JAK kinázy, a tím negativně reguluje odpověď na cytokiny [72].

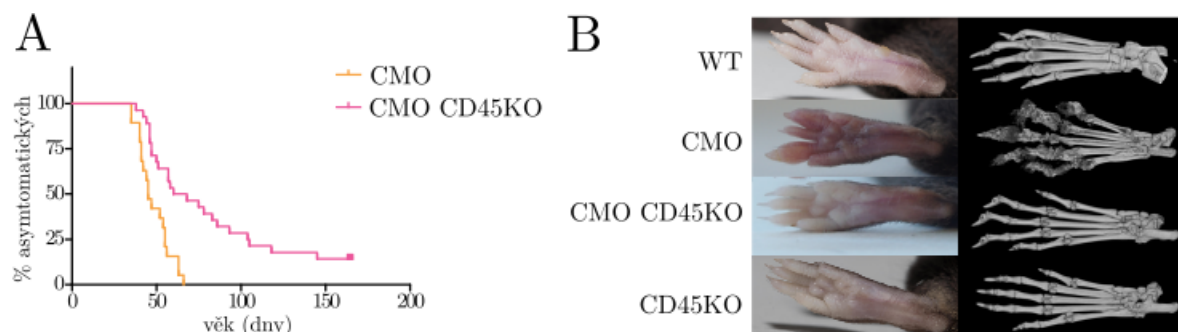
U mnoha procesů zmíněných v této kapitole není zcela objasněno, jakým způsobem je CD45 zapojena do regulace jednotlivých signálních drah a jestli tyto dráhy reguluje přímo, nebo prostřednictvím regulace SFK. K tomuto objasnění je potřeba dalšího studia.

## 2.6 Myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy s deficiencí CD45

V neutrofilních granulocytech, které u CMO modelu řídí rozvoj onemocnění, je exprimováno příliš mnoho různých SFK (viz kapitola 2.4.2). Vytvořit model deficientní ve všech těchto kinázách by bylo technicky velmi náročné. Všechny SFK jsou však regulovány prostřednictvím CD45. Z těchto důvodů byl ke studiu role SFK v CMO modelu zvolen myší model chronické autoinflamatorní osteomyelitidy s deficiencí CD45 (CMO CD45KO).

Myší model CMO CD45KO byl na Oddělení leukocytární signalizace, ÚMG, AV ČR studován již před začátkem vypracovávání této diplomové práce. Monitorování rozvoje prvních viditelných projevů onemocnění u těchto myší, provedené Mgr. Jarmilou Královou, Ph.D. ukázalo, že u CMO CD45KO myší dochází k pozdějšímu rozvoji onemocnění ve srovnání s CMO (obrázek 4A).  $\mu$ CT skeny těchto myší, provedené Mgr. Janem Procházkou, Ph.D. a Mgr. Františkem Špoutilem, Ph.D. v CCP, BIOCEV - ÚMG, AV ČR,

odhalily, že u CMO CD45KO myši bez viditelných projevů onemocnění ve věku 20 týdnů nedochází k destrukci kostní tkáně (obrázek 4B). Tyto výsledky naznačují, že CD45 a SFK hrají u CMO myši určitou roli v rozvoji či průběhu onemocnění.



Obrázek 4: **Rozvoj onemocnění u CMO a CMO CD45KO.** (A) Rozvoj prvních viditelných příznaků onemocnění. Bylo monitorováno 20 myší od každého modelu. (B) Fotografie a  $\mu$ CT skeny dolních končetin u myši ve věku 20 týdnů (140 dní).

### 3 Cíle práce

Výsledky monitorování rozvoje prvních viditelných projevů onemocnění a  $\mu$ CT skenů myšího modelu CMO CD45KO ukázaly, že deficience CD45 u CMO myší zpomaluje nástup onemocnění a v některých případech dokonce brání rozvoji zánětu a destrukci kostní tkáně. Cílem práce je dále charakterizovat myší model CMO CD45KO – určit zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk v kostní dřeni, slezině a krvi a popsat u tohoto modelu signální dráhy, o kterých je známo, že jsou u CMO myší deregulované.

Vzhledem k tomu, že PSTPIP2 interaguje s PEST fosfatázami a kinázou CSK [3, 4], které regulují SFK [5, 6], pracovní hypotézou je, že PSTPIP2 reguluje SFK přes tyto své interakční partnery. Dalším cílem práce je proto učit, jakou roli hraje v onemocnění CMO myší aktivita SFK. Jelikož je onemocnění řízené myeloidními buňkami, ve kterých je exprimováno příliš mnoho SFK (viz kapitola 2.4.2), a bylo by technicky velmi náročné vytvořit kombinovaného mutantu těchto kináz, byl k tomuto účelu využit právě CD45 deficientní model. Dále byl také využit inhibitor SFK – PP2 [7].

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Chemikálie

- 4-amino-5-(4-chlorofenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine (PP2): PP2 – CAS 172889-27-9 – Calbiochem, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- adenzintrifosfát (ATP), koncentrace – 50  $\mu$ M: Adenosine 5-triphosphate disodium salt hydrate, *Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA*
- bovinní sérový albumin (BSA), *Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA*
- bromfenolová modř, *AMRESCO<sup>®</sup>, Inc., Solon, OH, USA*
- detekční činidla pro western blot (ECL):
  - Radiance Plus Chemiluminescent Substrate, *Azure<sup>TM</sup> Biosystems, Inc., Dublin, CA, USA*
  - ECL připravené RNDr. Pavlou Angelisovou, CSc. a Janou Pokornou z Oddělení leukocytární signalizace, *ÚMG, AV ČR*
- dithiotreitol (DTT), *Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA*
- dodecylsírán sodný (SDS), *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*
- fetální bovinní sérum (FBS): Gibco FBS, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- glycerol, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR*
- glycin, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- hydrogenuhličitan draselný ( $\text{KHCO}_3$ ), *Erba Lachema, s.r.o., Brno, ČR*
- chlorid amonný ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), *Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA*
- izopropanol, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR*
- kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA), *Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA*



- lipopolysacharid (LPS): LPS *E. coli* 0127:B8, *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA
- metanol, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR*
- oxid křemičitý (silika), *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA
- persíran amonný (APS), *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA
- standard molekulových hmotností: Precision Plus Protein<sup>™</sup> Dual Color Standards, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*
- sušené odtučněné mléko, *Promil, Nový Bydžov, ČR*
- tetrametyletylendiamin (TEMED), *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA
- tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris), *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*
- Tween<sup>®</sup> 20, *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA

#### 4.1.2 Roztoky

- 70% etanol – připraveno a obdrženo z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- ACK pufr: 150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM EDTA
- blokovací pufr s BSA: PBS, 5% BSA, 0.05% Tween<sup>®</sup> 20
- blokovací pufr s mlékem: PBS, 5% sušené odtučněné mléko, 0.05% Tween<sup>®</sup> 20
- blotovací pufr: 20% metanol, 10mM Tris, 75mM glycin
- fosfátový pufr (PBS) - připraven a obdržen z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- fosfátový pufr s FBS (PBS s FBS): PBS, 2% FBS
- promývací pufr: PBS, 0.05% Tween<sup>®</sup> 20
- pufr pro přípravu separačního gelu pro SDS PAGE: 1.5M Tris, 0.4% SDS, pH 8.8
- pufr pro přípravu zaostřovacího gelu pro SDS PAGE: 0.5M Tris, 0.4% SDS, pH 6.8

- pufr pro SDS PAGE: 25mM Tris, 192mM glycin, 0.1% SDS
- roztok akrylamidu: Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (30 %), *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*
- roztok EDTA: 0.02% EDTA v PBS
- suspenze siliky pro aktivace buněk: PBS, 5 mg/ml silika
- suspenze siliky pro aktivaci buněk pro detekci štěpení IL-1 $\beta$ : PBS, 15 mg/ml silika
- vzorkový pufr pro SDS PAGE (2 $\times$  koncentrovaný, neredukovaný): 128mM Tris pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromfenolová modř

#### 4.1.3 Média

- IMDM médium s FBS: IMDM (připraveno a obdrženo z *Přípravy médií, ÚMG, AV ČR*), 0.1% FBS

#### 4.1.4 Myší modely

- C57Bl/6J (dále WT) – černá myš divokého typu – obdržena ze zvěřince *ÚMG, AV ČR*
- CMO x C57Bl/6J (dále CMO) – myší model C.Cg-*Pstpip2*<sup>cmo</sup>/J s mutací v genu *Pstpip2* c.293T $\rightarrow$ C vedoucí k aminokyselinové záměně L98P [2] s genetickým pozadím Balb/C – obdržen z *The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)* – byl minimálně 10krát zpětně křížen na genetické pozadí C57Bl/6J [31]
- *Ptprc*<sup>-/-</sup> (dále CD45KO) – myší model B6;129-*Ptprc*<sup>tm1Holm</sup>/H s narušeným exonem 9 v genu *Ptprc* vedoucí ke ztrátě exprese CD45 [62] – obdržen z *European Mouse Mutant Archive* [73]
- (CMO x C57Bl/6J) x *Ptprc* (dále CMO CD45KO) – homozygotní myši s mutací v genech *Pstpip2* a *Ptprc* byly získány křížením myši CMO a CD45KO za vzniku heterozygotních myši a po následném křížení těchto heterozygotů byli vybráni homozygotní jedinci, kteří byli dále kříženi

Na experimenty byly použity myši ve věku 5–7 týdnů bez viditelných projevů onemocnění.

#### 4.1.5 Protilátky

Tabulka 1: Protilátky použité na průtokovou cytometrii.

| název    | klon  | fluorofor | výrobce   |
|----------|-------|-----------|---|
| CD3      | 17A2  | PE        | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| CD3      | 17A2  | FITC      | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| CD11b    | M1/70 | APC       | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| CD11b    | M1/70 | FITC      | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| CD11c    | N418  | APC       | <i>eBioscience<sup>®</sup> Inc., San Diego, CA, USA</i>   |
| CD16/32  | 93    | PE-Cy7    | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| CD19     | 6D5   | PB        | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| CD34     | RAM34 | FITC      | <i>eBioscience<sup>®</sup> Inc., San Diego, CA, USA</i>   |
| CD117    | 2B8   | PE        | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| F4/80    | BM8   | PE        | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| Fc-block | 2.4G2 | –         | Sbírka hybridomů Oddělení leukocytární signalizace, ÚMG, AV ČR, protilátku připravily RNDr. Pavla Angelisová, CSc. a Jana Pokorná |
| Lin-1    | –     | PB        | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| Ly6C     | HK1.4 | PE-Cy7    | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| Ly6G     | 1A8   | APC       | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| Ly6G     | 1A8   | PB        | <i>BioLegend<sup>®</sup>, Inc., San Diego, CA, USA</i>  |
| Sca-1    | D7    | APC       | <i>eBioscience<sup>®</sup> Inc., San Diego, CA, USA</i>   |

Tabulka 2: **Protilátky použité na detekci imobilizovaných proteinů na PVDF membráně.**

| <b>název</b>   | <b>klon</b>  | <b>výrobce</b>  |
|--|--------------|---|
| Anti- $\beta$ -aktin   | AC-74        | <i>Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA</i>           |
| Erk2 (C-14): sc-154  | polyklonální | <i>Santa Cruz<sup>®</sup> Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA</i> |
| Anti-GAPDH (G9545)   | polyklonální | <i>Sigma-Aldrich<sup>®</sup> 20 Co., St. Louis, MO, USA</i>           |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP-conjugate                                  | polyklonální | <i>Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA</i>                  |
| Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP-conjugate                                 | polyklonální | <i>Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA</i>                  |
| IL-1 $\beta$   | D3H1Z        | <i>Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA</i>   |
| Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP <sup>®</sup> | D13.14.4E    | <i>Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA</i>   |
| Phospho-Src Family (Tyr416)  | polyklonální | <i>Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA</i>   |
| Phospho-Lyn (Tyr507)   | polyklonální | <i>Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA</i>   |

#### 4.1.6 Komerční soupravy

- souprava pro negativní selekci granulocytů: Neutrophil Isolation Kit mouse, *Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Německo*
- souprava pro purifikaci buněk nesoucích povrchový znak CD19: CD19 MicroBeads mouse, *Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Německo*

#### 4.1.7 Další materiály

- 48 a 96-jamkové destičky na buněčné kultury, *Techno Plastic Products<sup>®</sup> AG, Trasadingen, Švýcarsko*
- filtrační papíry na western blot Whatman 17CHR, *Whatman<sup>TM</sup>, Inc., Maidstone, Velká Británie*
- injekční stříkačky 5 ml: Inject<sup>®</sup> Solo, *B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo*
- jehly k injekčním stříkačkám – 0.3×12 mm: Sterican<sup>®</sup>, *B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo*
- lanceta: Goldenrod Animal Lancet, *MEDIpoint, Inc., St. Mineola, NY, USA*
- mikrosítka 42 µm: polyamidové technické síto Uhelon 130T, *SILK & PROGRESS spol. s r. o., Brněnec, ČR*
- mikrozkuhavky 1.5 ml *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
- Petriho misky – průměr 60 mm, *GAMA<sup>®</sup> GROUP a.s., České Budějovice, ČR*
- Polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána na western blot: Immobilon<sup>®</sup>-P PVDF Membrane, 0.45 µm pore size, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- špičky k automatickým pipetám
- zkuhavky 15 ml a 50 ml, *Techno Plastic Products<sup>®</sup> AG, Trasadingen, Švýcarsko*

#### 4.1.8 Vybavení laboratoře

- aparatura na SDS PAGE:
  - Mini-PROTEAN<sup>®</sup> System, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*
  - Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*
  - PowerPac<sup>TM</sup> Basic Power Supply, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA*

- aparatura na western blot:
  - Semi-Phor<sup>TM</sup> TE70 Semi Dry Transfer Unit, *Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA, USA*
  - Electrophoresis Power Supply – EPS 301 *Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*
- centrifuga:
  - Centrifuge 5417 R, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
  - Centrifuge 5810 R, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
- průtokový cytometr
  - FACSymphony<sup>TM</sup> A5, *BD<sup>TM</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*
  - LSR II, *BD<sup>TM</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*
- inkubátor pro buněčné kultury: MITRE 4000 Series, *Contherm Scientific Limited, Korokoro, Nový Zéland*
- magnetický separátor: autoMACS<sup>®</sup> Pro Separator, *Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Německo*
- nerezové nůžky: Fine Scissors 91461-11, *Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Německo*
- ohřívací bloček: Thermomixer Comfort 5355, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
- přístroj na počítání buněk v suspenzi: Cellometer<sup>®</sup> Auto T4 Plus Cell Counter, *Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA*
- sada automatických pipet, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- sklíčka na počítání buněk, *Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA*
- třepačka: CLASSIC Vortex Mixer, *VELP Scientifica, Inc., Bohemia, NY, USA*
- třepačka s kývavým pohybem: 348/1 „ASSISTENT“ Rocking shaker, CE type, *Karl Hecht Tube Roller Mixers, Progen Scientific, Londýn, Velká Británie*

- ultrazvukový homogenizátor: Ultrasonic Homogenizer-4710 Series, *Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, Illinois, USA*
- váhy:
  - Ohaus<sup>®</sup> Scout<sup>®</sup> Pro balance, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
  - Analytical Balance MS105, *METTLER TOLEDO, Praha, ČR*
- systém pro zobrazování chemiluminiscence: Azure<sup>™</sup> Imager c300, *Azure<sup>™</sup> Biosystems, Inc., Dublin, CA, USA*

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Izolace buněk krve

Několik kapek krve v 1 ml 0.02% roztoku EDTA v PBS bylo centrifugováno 450g/5 min/4 °C. Peleta byla resuspendována v 1 ml ACK pufru a inkubována 3 min při pokojové teplotě (tím bylo dosaženo lýzy erytrocytů) a znovu centrifugována 450g/5 min/4 °C.

### 4.2.2 Izolace buněk sleziny

Myším usmrceným cervikální dislokací ve věku 5–7 týdnů byla odebrána slezina, umístěna do Petriho misky s 2% FBS v PBS a rozmělněna. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes mikrosítko a centrifugována 450g/5 min/4 °C. Peleta byla resuspendována v 3 ml ACK pufru a inkubována 3 min při pokojové teplotě, tím bylo dosaženo lýzy erytrocytů. Následně byla suspenze promíchána s 12 ml 2% FBS v PBS a centrifugována 450g/5 min/4 °C.

### 4.2.3 Izolace buněk kostní dřeně

Z myší usmrcených cervikální dislokací ve věku 5–7 týdnů byly vyjmuty *femur* a *tybia* z obou dolních končetin, očištěny od svaloviny a umístěny do Petriho misky. Oba konce každé kosti byly odstřiženy. Kosti byly injekční stříkačkou s jehlou promyty 2% FBS v PBS. Získaná suspenze byla centrifugována 450g/5 min/4 °C. Peleta byla resuspendována v 2.5 ml ACK pufru a inkubována 3 min při pokojové teplotě, tím bylo dosaženo lýzy erytrocytů. Následně byla suspenze přefiltrována přes mikrosítko, promíchána s 12 ml 2% FBS v PBS a centrifugována 450g/5 min/4 °C.

### 4.2.4 Purifikace granulocytů

Selekce na magnetickém separátoru je metoda umožňující oddělení různých buněčných typů na základě odlišné exprese povrchových buněčně-specifických molekul. Na tyto povrchové molekuly jsou navázány specifické protilátky konjugované buď přímo s magnetickými kuličkami, nebo s biotinem. V druhém případě jsou magnetické kuličky konjugovány s protilátkou proti biotinu a na značené buňky navázány až při další inkubaci. Takto značené buňky jsou odděleny od neznačených buněk na magnetické koloně.

Granulocyty byly touto metodou purifikovány s využitím negativní selekce. Při negativní selekci jsou izolovány neznačené buňky. Nedochází tak k vazbě protilátek na povr-



chové molekuly granulocytů (značeny jsou ostatní buněčné typy). Tím je sníženo riziko jejich aktivace, následné degranulace či desenzitizace a zkreslení výsledků při aktivačních experimentech.

Pro purifikaci granulocytů byla použita komerční souprava Neutrophil Isolation Kit mouse od *Miltenyi Biotec*, která však obsahuje protilátku vázající molekulu B220 (izofor-  
ma CD45 exprimovaná u B-lymfocytů). K odstranění B-lymfocytů byla proto v případě obou CD45 deficientních modelů použita též komerční souprava CD19 MicroBeads mouse, *Miltenyi Biotec*. Veškeré resuspendování pelet bylo provedeno velmi šetrně pipetou s ušříženým koncem špičky, aby nedošlo k nežádoucí aktivaci granulocytů.

Peleta buněk kostní dřeně byla resuspendována ve 120  $\mu$ l PBS a 25  $\mu$ l směsi protilátek z komerční soupravy pro izolaci granulocytů a inkubována 10 min při 4 °C. Poté byla suspenze zlehka promíchána s 4 ml PBS a centrifugována 450g/5 min/4 °C. Následně byla peleta resuspendována v 200  $\mu$ l PBS a 50  $\mu$ l magnetických kuliček z komerční soupravy pro izolaci granulocytů. Tato suspenze byla inkubována 5 min při 4 °C, zlehka promíchána s 4 ml PBS a centrifugována 450g/5 min/4 °C. Získané pelety WT a CMO byly resuspendovány v 2 ml PBS.

V případě obou CD45 deficientních kostních dření bylo ještě potřeba označit B-lymfocyty. Proto byly tyto pelety resuspendovány v 230  $\mu$ l PBS a 30  $\mu$ l komerční soupravy pro purifikaci buněk nesoucích povrchový znak CD19 a inkubovány 15 min při 4 °C. Poté byla suspenze zlehka promíchána s 4 ml PBS a centrifugována 450g/5 min/4 °C. Získané pelety byly resuspendovány v 2 ml PBS.

Odstranění B-lymfocytů u CD45 deficientních kostních dření bylo na rozdíl od WT a CMO provedeno dodatečně. To by mohlo ovlivnit výsledky experimentů, které byly s purifikovanými granulocyty provedeny. I přesto však bylo množství manipulací s buňkami podobné. Hlavním cílem experimentů navíc bylo zhodnotit, jakým způsobem deficiencie CD45 změní fenotyp CMO. To by tímto krokem nemělo být ovlivněno.

Neoznačené granulocyty byly purifikovány negativní selekcí na magnetickém separátoru autoMACS<sup>®</sup> Pro Separator, *Miltenyi Biotec*. Úspěšnost purifikace byla ověřena průtokovou cytometrií a pohybovala se mezi 75 a 90 %. Hlavní kontaminací byly monocyty, obvykle 1–15 %.

#### 4.2.5 Fluorescenční průtoková cytometrie

Fluorescenční průtoková cytometrie je metoda umožňující rychlou analýzu velkého množství jednotlivých buněk v suspenzi na základě jejich velikosti, granularity a fluorescence. V této práci byla tato metoda využita k rozlišení vybraných buněčných typů na základě exprese povrchových buněčně-specifických molekul. Na tyto molekuly byly navázány protilátky konjugované s různými fluorofory. Na základě fluorescence jednotlivých buněk bylo určeno zastoupení různých buněčných typů ve vzorku. Měření bylo provedeno na fluorescenčním průtokovém cytometru FACSymphony™ A5, *BD™ Biosciences* nebo LSR II, *BD™ Biosciences*. Použité lasery a filtry jsou uvedeny u jednotlivých protilátek v tabulce 3–6.

#### 4.2.6 Značení buněk pro průtokovou cytometrii

1 milion buněk byl resuspendován v 45 µl připraveného roztoku PBS s příslušnou sadou protilátek (viz tabulka 3–6) a 1 µl Fc-blocku a inkubován 30 min při 4 °C. Poté byla suspenze promíchána s 200 µl PBS a centrifugována 450g/5 min/4 °C. Tento promývací krok byl zopakován ještě dvakrát. Získané pelety byly resuspendovány v 120 µl PBS. Takto značené buňky byly analyzovány fluorescenční průtokovou cytometrií.

Tabulka 3: **Sada protilátek pro značení myeloidních progenitorových buněk v kostní dřeni.**

| protilátka | fluorofor | koncentrace<br>(mg/ml) | ředění | laser – vlnová<br>délka (nm) | emisní filtr |
|------------|-----------|------------------------|--------|------------------------------|--------------|
| CD16/32    | PE-Cy7    | 0.2                    | 100×   | 488                          | 780/60       |
| CD34       | FITC      | 0.5                    | 50×    | 488                          | 530/30       |
| CD117      | PE        | 0.2                    | 100×   | 488                          | 575/26       |
| Lin-1      | PB        | 0.5                    | 50×    | 405                          | 450/50       |
| Sca-1      | APC       | 0.2                    | 100×   | 633 nebo 640                 | 660/20       |

Tabulka 4: Sada protilátek pro značení myelodních populací buněk ve slezině a kostní dřeni.

| protilátka | fluorofor | koncentrace<br>(mg/ml) | ředění | laser – vlnová<br>délka (nm) | emisní filtr |
|------------|-----------|------------------------|--------|------------------------------|--------------|
| CD11b      | FITC      | 0.5                    | 300×   | 488                          | 530/30       |
| CD11c      | APC       | 0.2                    | 200×   | 633 nebo 640                 | 660/20       |
| Ly6C       | PE-Cy7    | 0.2                    | 500×   | 488                          | 780/60       |
| Ly6G       | PB        | 0.5                    | 200×   | 405                          | 450/50       |

Tabulka 5: Sada protilátek pro značení dalších významných populací buněk ve slezině a kostní dřeni.

| protilátka | fluorofor | koncentrace<br>(mg/ml) | ředění | laser – vlnová<br>délka (nm) | emisní filtr |
|------------|-----------|------------------------|--------|------------------------------|--------------|
| CD3        | FITC      | 0.5                    | 100×   | 488                          | 530/30       |
| CD11b      | APC       | 0.2                    | 200×   | 633 nebo 640                 | 660/20       |
| CD19       | PB        | 0.1                    | 100×   | 405                          | 450/50       |
| F4/80      | PE        | 0.2                    | 300×   | 488                          | 575/26       |

Tabulka 6: Sada protilátek pro značení buněk krve.

| protilátka | fluorofor | koncentrace<br>(mg/ml) | ředění | laser – vlnová<br>délka (nm) | emisní filtr |
|------------|-----------|------------------------|--------|------------------------------|--------------|
| CD3        | PE        | 0.5                    | 200×   | 488                          | 575/26       |
| CD11b      | FITC      | 0.5                    | 300×   | 488                          | 530/30       |
| CD19       | PB        | 0.1                    | 100×   | 405                          | 450/50       |
| Ly6C       | PE-Cy7    | 0.2                    | 500×   | 488                          | 780/60       |
| Ly6G       | APC       | 0.5                    | 200×   | 633 nebo 640                 | 660/20       |

#### 4.2.7 Aktivace buněk silikou

Buňky byly resuspendovány v IMDM médiu s 0.1% FBS, přeneseny do 48jamkové destičky – 2 miliony buněk/170  $\mu$ l/jamka a inkubovány 30 min při 37 °C. Pokud byly buňky aktivovány za přítomnosti inhibitoru PP2, byl k nim tento inhibitor o výsledné koncentraci 10  $\mu$ M (0.4  $\mu$ l 5mM PP2) přidán 10 min před aktivací.

Po 30 min inkubace bylo k buňkám přidáno 30  $\mu$ l suspenze siliky o koncentraci 5 mg/ml. Buňky byly aktivovány po dobu 2, 5, 15 nebo 30 min při 37 °C. K nestimulované kontrole (0 min) bylo přidáno 30  $\mu$ l PBS. Po uplynutí doby aktivace byly buňky lyzovány přidáním 200  $\mu$ l 2 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS PAGE.

#### 4.2.8 Aktivace buněk pro detekci štěpení IL-1 $\beta$

Buňky byly resuspendovány v IMDM médiu s 0.1% FBS. K buňkám, které byly následně aktivovány, bylo přidáno LPS o výsledné koncentraci 100 ng/ml. Následně byly buňky přeneseny do 96jamkové destičky – 2 miliony buněk/90  $\mu$ l/jamka a inkubovány po dobu 3 h při 37 °C. Pokud byly buňky aktivovány za přítomnosti inhibitoru PP2, byl k nim tento inhibitor o výsledné koncentraci 20  $\mu$ M (0.4  $\mu$ l 5mM PP2) přidán 10 min před aktivací.

Po 3 h bylo k buňkám přidáno 10  $\mu$ l suspenze siliky o koncentraci 15 mg/ml. Takto byly buňky aktivovány po dobu 30 min při 37 °C. Ke kontrole bez LPS (0 min) bylo přidáno 10  $\mu$ l PBS. Jako pozitivní kontrola byly využity buňky z CMO myši, které byly aktivovány 10  $\mu$ l ATP po dobu 30 min při 37 °C. Po uplynutí doby stimulace byly buňky lyzovány přidáním 100  $\mu$ l 2 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS PAGE.

#### 4.2.9 Příprava vzorků na SDS PAGE

Fragmentace DNA v lyzátech byla zajištěna homogenizací vzorků ultrazvukovým homogenizátorem 20 s/60 % maximální amplitudy. K lyzátům bylo k nim přidáno DTT o výsledné koncentraci 1 %, tím byly redukovány disulfidické můstky. Lyzáty byly zahřáty v ohřívacím bločku 2 min/98 °C, aby byly proteiny v nich zcela denaturovány.

#### 4.2.10 SDS PAGE

Polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti SDS (SDS PAGE) je separační metoda, při které dochází k separaci proteinů v elektrickém poli na základě jejich molekulové hmotnosti. SDS se váže na proteiny, zajišťuje jejich denaturaci a uděluje jim negativní náboj.

Roztok separačního gelu byl připraven podle tabulky 7. TEMED a APS byly přidány nakonec. Roztok byl promíchán, přenesen do připravené aparatury Mini-PROTEAN<sup>®</sup> System, *Bio-Rad Laboratories* a převrstven izopropanolem. Koncentrace akrylamidu v separačním gelu byla 13.5 % pro detekci IL-1 $\beta$  nebo 10 % pro detekci ostatních proteinů. Délka gelu byla 5 cm.

Po ukončení polymerace separačního gelu byl izopropanol odstraněn a gel převrstven roztokem zaostřovacího gelu, do kterého byl umístěn hřebínek k vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Složení zaostřovacího gelu viz tabulka 7. TEMED a APS byly přidány nakonec. Koncentrace akrylamidu v zaostřovacím gelu byla 3.6 %. Délka gelu byla 1.5 cm.

Po ukončení polymerace zaostřovacího gelu byl hřebínek odstraněn a skla s gely umístěny do aparatury Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell, *Bio-Rad Laboratories* s pufrem pro SDS PAGE, kterým byly též naplněny jamky pro nanášení vzorků. Do jamek bylo nanese-  
no 20  $\mu$ l vzorku v případě detekce IL-1 $\beta$  nebo 30  $\mu$ l vzorku v případě detekce ostatních proteinů. Aparatura byla zapojena do elektrického zdroje o konstantním napětí 90 V pro zaostřovací gel a 120 V pro separační gel.

Tabulka 7: Složení 10% a 13,5% separačního a 3.6% zaostřovacího gelu.

| Objem: 10 ml                          | 10%  | 13.5% | 3.6% |
|---------------------------------------|------|-------|------|
| 1.5M Tris, 0.4% SDS, pH 8.8 (ml)      | 2.5  | 2.5   | –    |
| 0.5M Tris, 0.4% SDS, pH 6.8 (ml)      | –    | –     | 2.5  |
| akrylamid/bis roztok 29:1 (30 %) (ml) | 3.33 | 4.5   | 1.2  |
| TEMED ( $\mu$ l)                      | 10   | 10    | 20   |
| 20% APS ( $\mu$ l)                    | 50   | 50    | 50   |
| ddH <sub>2</sub> O (ml)               | 4.11 | 2.94  | 6.24 |

#### 4.2.11 Western blot

Western blot je metoda, při které dochází k přenosu proteinů rozdělených polyakrylamidovou gelovou elektroforézou na membránu. Na ní jsou vybrané proteiny či skupiny proteinů detekovány specifickými protilátkami.

PVDF membrána o rozměrech 5×8.5 cm a velikosti pórů 0.45 μm byla na třepačce s kývavým pohybem inkubována 20 min v metanolu a následně alespoň 10 min v blotovacím pufru. Pro přenos proteinů na PVDF membránu byla použita aparatura pro western blot Semi-Phor™ TE70 Semi Dry Transfer Unit, *Hoefer Scientific Instruments*, do které byl od katody k anodě umístěn filtrační papír, PVDF membrána, polyakrylamidový gel a filtrační papír. Filtrační papíry měly stejné rozměry jako PVDF membrána (5×8.5 cm). Přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru 2 h při konstantním elektrickém proudu 0.8 mA/cm<sup>2</sup>.

#### 4.2.12 Imunodetekce proteinů imobilizovaných na PVDF membráně

PVDF membrána byla po přenosu proteinů 3× rychle promyta v promývacím pufru a inkubována 1 h při pokojové teplotě v blokovací pufru s mlékem pro následnou detekci protilátkou IL-1β nebo Phospho-Lyn (Tyr507) nebo v blokovacím pufru s BSA pro následnou detekci protilátkou Phospho-Src Family (Tyr416) nebo Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®. Po zablokování byla membrána opět 3× rychle promyta v promývacím pufru a inkubována přes noc při 4 °C se specifickou primární protilátkou obvykle 1000× ředěnou v promývacím pufru s 1% BSA.

Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána při pokojové teplotě 3× rychle a 2× po dobu 15 min promyta promývacím roztokem, inkubována 35 min při pokojové teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou 10000× v promývacím roztoku s 1% BSA a opět 3× rychle a 2× po dobu 15 min při pokojové teplotě promyta promývacím roztokem. Všechny promývací a inkubační kroky probíhaly na třepačce s kývavým pohybem.

Na každou membránu byl přidán 1 ml ECL roztoků smíchaných 1:1. Membrány byly zpracovány systémem pro zobrazování chemiluminiscence Azure™ Imager c300, *Azure™ Biosystems*.

Po detekci chemiluminiscence byla membrána 3× rychle promyta v promývacím pufru a krátce zmrazena. Po rozmražení byla inkubována 1–2 h při pokojové teplotě s primární

protilátkou vázající se na protein používaný jako kontrola nanášky (GAPDH,  $\beta$ -aktin nebo ERK2). Tato protilátka byla obvykle 1000 $\times$  ředěna v promývacím pufru s 1% BSA. Po této inkubaci následovaly promývací kroky, inkubace se sekundární protilátkou, opět promývací kroky a detekce chemiluminiscence ve stejné rozsahu, jako bylo popsáno výše.

## 4.3 Analýza dat

### 4.3.1 Analýza dat z průtokové cytometrie

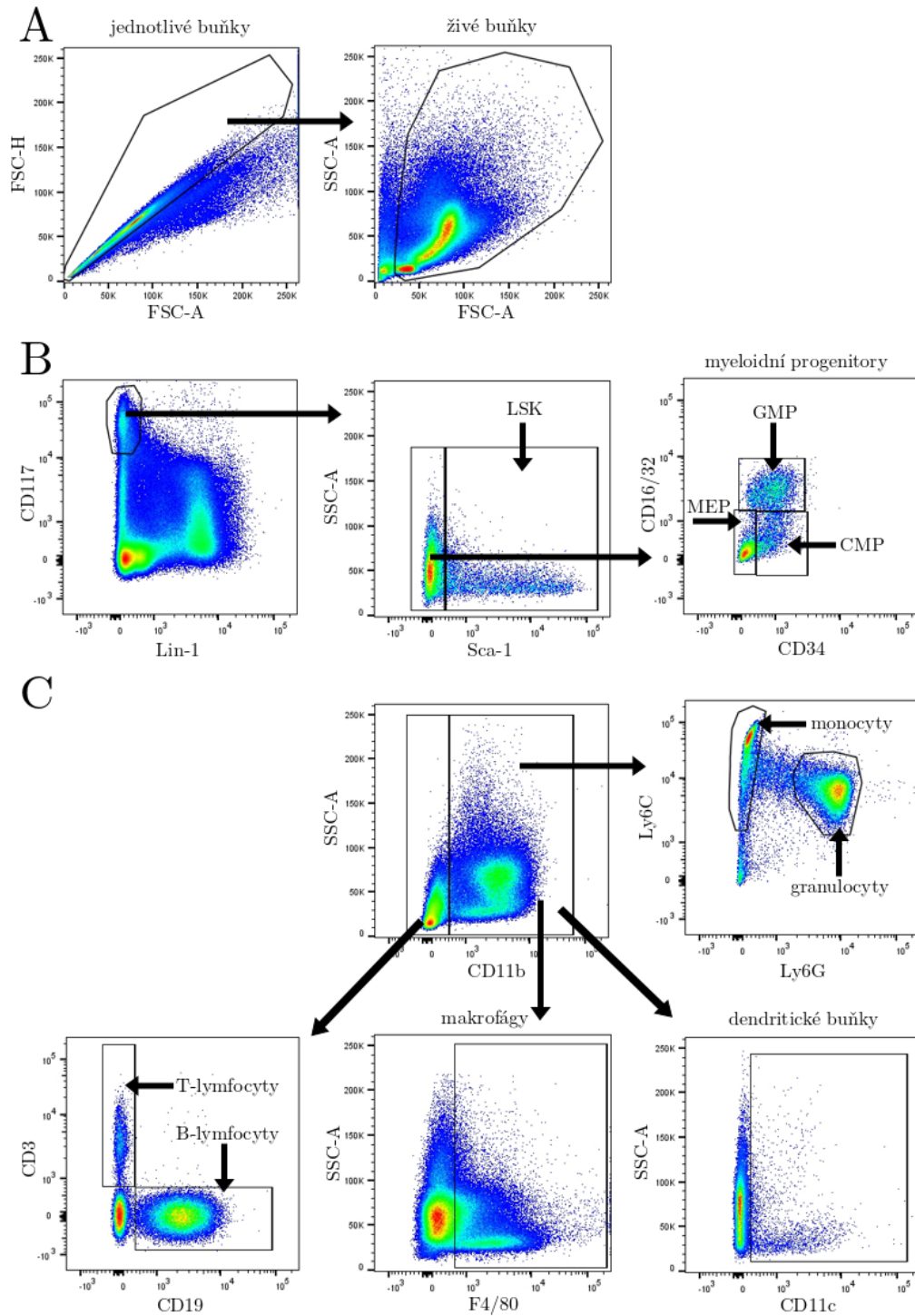
Výsledky z fluorescenčního průtokového cytometru byly zpracovány v analyzačním softwaru FlowJo<sup>TM</sup>10.6.2, *BD<sup>TM</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*. V softwaru byly vybrány jednotlivé buněčné populace na základě exprese povrchových buněčně-specifických molekul. Strategie jejich značení a výběru (anglicky tzv. „gating strategy“) je zobrazena na obrázku 5.

### 4.3.2 Analýza western blotů

Výsledky chemiluminiscence na membránách byly zpracovány v analyzačním softwaru AIDA Advanced Image Data Analyzer 5.0, *Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, Německo*. Hodnoty chemiluminiscence značených analyzovaných proteinů byly normalizovány na kontrolu nanášky. Tyto hodnoty pak byly srovnány s hodnotou referenčního vzorku nebo vzorku vybraného v rámci experimentu.

### 4.3.3 Statistická analýza dat

Statistická analýza dat a tvorba grafů byla provedena v softwaru GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0, *GraphPadSoftware, Inc., San Diego, CA, USA*. Q-testem byly vyřazeny odlehlé hodnoty. Shapiro-Wilkovým testem byla ověřena normální distribuce dat. Data s normální distribucí byla podrobena testu ANOVA následovanému Tukeyovým testem. Při nenormální distribuci dat byla provedena analýza Kruskal-Wallisovým testem následovaným testem Dunnové. Hranice statistické významnosti byla stanovena na  $p < 0.05$ . V grafech je znázorněna střední hodnota, střední chyba průměru a statistická významnost  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)



Obrázek 5: **Identifikace buněčných populací („gating strategy“).** (A) Oddělení jednotlivých buněk od dvojic a dalších agregátů (vlevo) a identifikace živých buněk (vpravo). Z živých buněk byly následně vybrány další subpopulace v B a C. (B) Strategie pro identifikaci jednotlivých typů myeloidních progenitorů. (C) Souhrn strategií pro identifikaci významných populací imunitních buněk. Provedeno vždy v závislosti na použité sadě protilátek.



## 5 Výsledky

### 5.1 Zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk

U každého myšího modelu byla pomocí průtokové cytometrie stanovena relativní četnost vybraných typů imunitních buněk v kostní dřeni, slezině a krvi. Tyto experimenty byly provedeny ve spolupráci s Mgr. Jarmilou Královou, Ph.D.

#### 5.1.1 Kostní dřěň

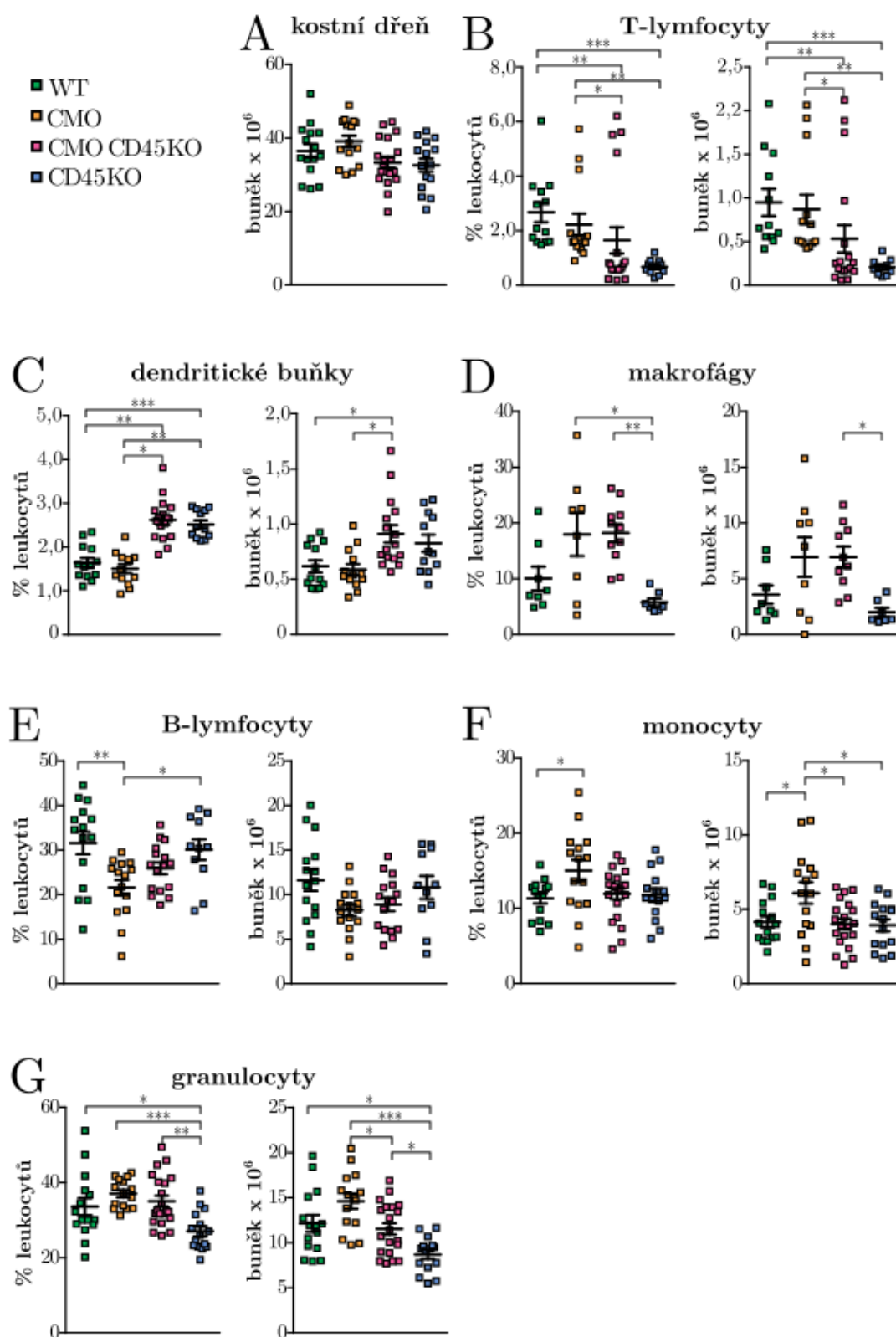
Nejprve bylo zjištěno množství buněk kostní dřěně u každého z modelů. Jejich počty se mezi modely významně nelišily (obrázek 6A). Poté byla sledována nejen relativní četnost vybraných typů imunitních buněk, ale také jejich absolutní počty.

Fenotyp CMO CD45KO ve většině případů kopíroval buď fenotyp CD45KO, nebo CMO (obrázek 6). U obou CD45 deficientních modelů byla podstatně nižší relativní četnost T-lymfocytů. Stejně tak byl výrazně snížen jejich absolutní počet (obrázek 6B). Naproti tomu byly u obou CD45 deficientních modelů výrazně zvýšeny relativní četnost i absolutní počet dendritických buněk (obrázek 6C). Dále byly u CMO CD45KO stejně jako u CMO mírně zvýšeny relativní četnost i absolutní počet makrofágů, nicméně se ve srovnání s WT nejednalo o statisticky významný rozdíl (obrázek 6D).

Relativní četnost B-lymfocytů byla u CMO výrazně snížena ve srovnání s WT a CD45KO. Ve srovnání s CMO CD45KO se však jednalo jen o mírný rozdíl, který nebyl statisticky významný. Tento trend byl patrný také u absolutního počtu B-lymfocytů. Absolutní počet B-lymfocytů byl u CMO mírně snížen, nicméně se nejednalo o statisticky významný rozdíl (obrázek 6E).

Naopak relativní četnost monocytů byla u CMO mírně zvýšena. V případě absolutního počtu monocytů bylo toto zvýšení ve srovnání s ostatními modely statisticky významné (obrázek 6F).

Relativní četnost granulocytů byla u CD45KO podstatně snížena ve srovnání s ostatními modely. Jejich absolutní počet byl u CD45KO také výrazně snížen a u CMO naopak výrazně zvýšen (obrázek 6G).



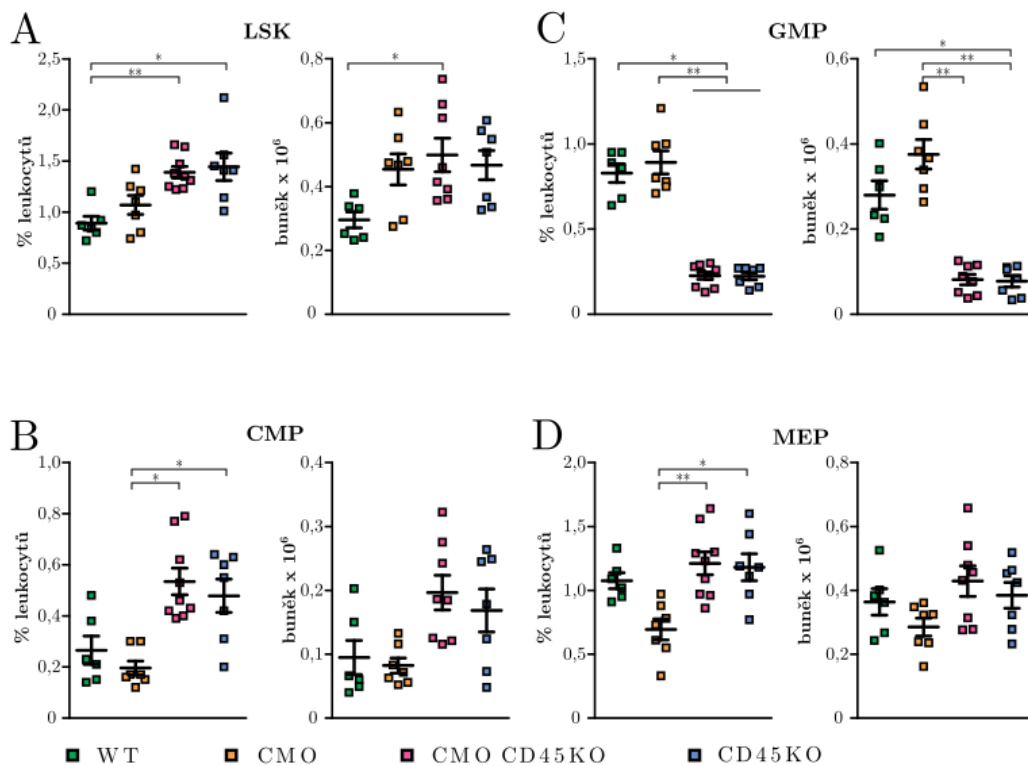
Obrázek 6: Zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk v kostní dřeni. (A) Celkové množství buněk izolovaných z kostní dřeni. (B-G) Graf vlevo vždy znázorňuje relativní četnost, graf vpravo absolutní počty daného typu imunitních buněk.

Byly také studovány relativní četnost a absolutní počet myeloidních progenitorů v kostní dřeni. Fenotyp CMO CD45KO kopíroval fenotyp CD45KO (obrázek 7). U obou CD45 deficientních modelů byly podstatně zvýšeny relativní četnost i absolutní počet LSK (kmenové buňky a časné progenitory neexprimující povrchové molekuly charakteristické pro různé buněčné typy a exprimující molekuly CD117 a Sca-1) ve srovnání s WT (obrázek 7A).

Podobně byly u obou CD45 deficientních modelů mírně, avšak statisticky nevýznamně, zvýšeny relativní četnost a absolutní počet CMP (společný progenitor myeloidních buněk) ve srovnání s WT. V případě relativního zastoupení se ve srovnání s CMO jednalo o statisticky významný rozdíl (obrázek 7B).

Naproti tomu byly u obou CD45 deficientních modelů výrazně sníženy relativní četnost i absolutní počet GMP (společný progenitor granulocytů a makrofágů) ve srovnání s WT i CMO (obrázek 7C).

U CMO byla výrazně snížena relativní četnost MEP (společný progenitor megakaryocytů a erytrocytů) ve srovnání s oběma CD45 deficientními modely. Ve srovnání s WT se však jednalo jen o mírný rozdíl, který nebyl statisticky významný. Tento trend byl pozorovatelný také u absolutního počtu MEP. Absolutní počet MEP byl u CMO mírně snížen, ale nejednalo se o statisticky významný rozdíl (obrázek 7D).



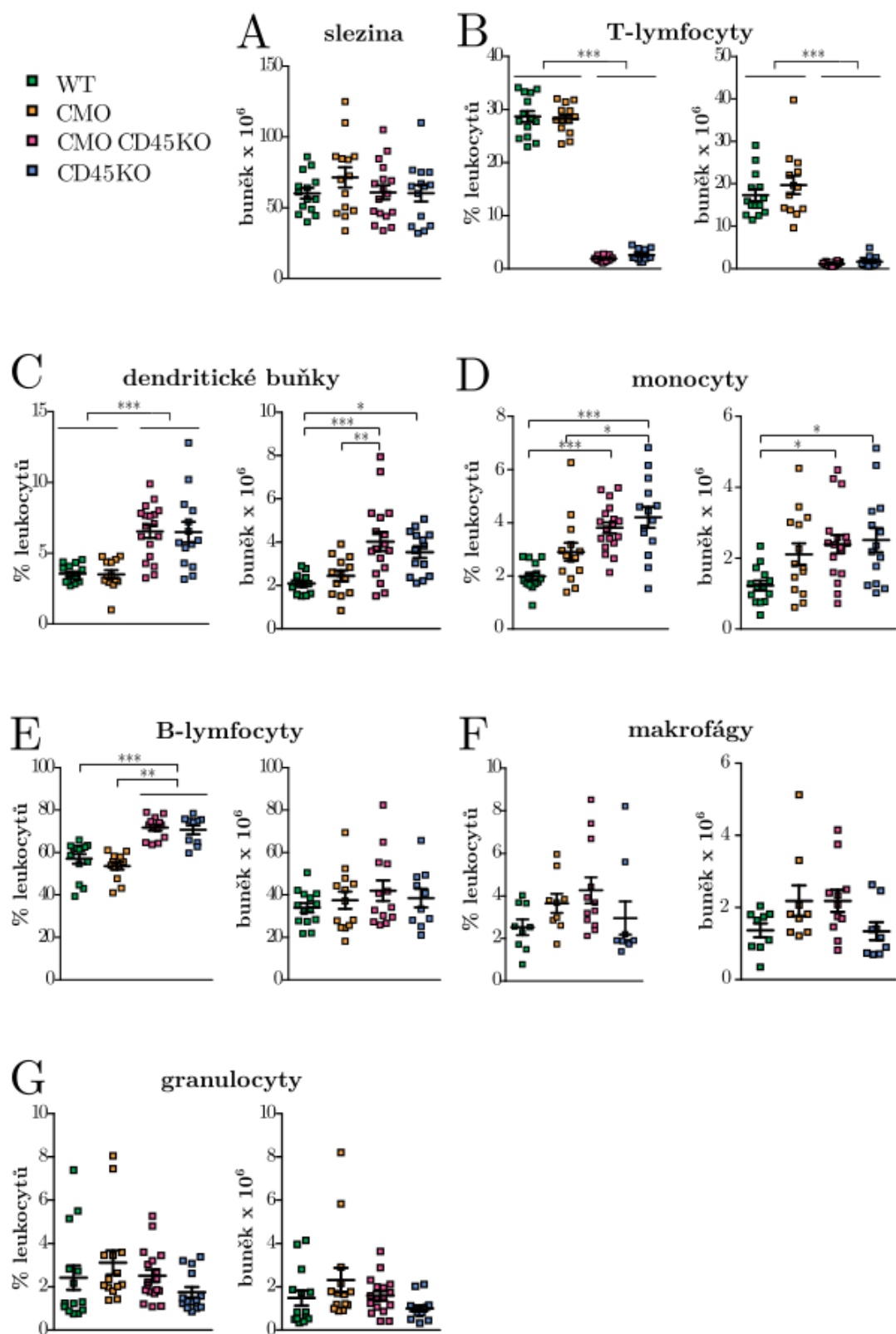
Obrázek 7: Zastoupení jednotlivých typů myeloidních progenitorů v kostní dřeni. (A-D) Graf vlevo vždy znázorňuje relativní četnost, graf vpravo absolutní počty daného typu progenitoru.

### 5.1.2 Slezina

Nejprve byla zjištěna celularita sleziny. Ta se mezi modely významně nelišila (obrázek 8A). Poté byla mezi jednotlivými modely porovnána nejen relativní četnost, ale také absolutní počty jednotlivých typů imunitních buněk.

Stejně jako v případě kostní dřeně fenotyp CMO CD45KO kopíroval buď fenotyp CMO, nebo CD45KO (obrázek 8). U obou CD45 deficientních modelů nebyly ve slezině téměř žádné T-lymfocyty (obrázek 8B). Oproti tomu byly u těchto dvou modelů podstatně zvýšeny relativní četnost i absolutní počet dendritických buněk a monocytů (obrázek 8C, D). Stejně tak relativní počet B-lymfocytů byl u obou CD45 deficientních modelů podstatně zvýšen. Nicméně jejich absolutní počet byl u všech modelů srovnatelný (obrázek 8E).

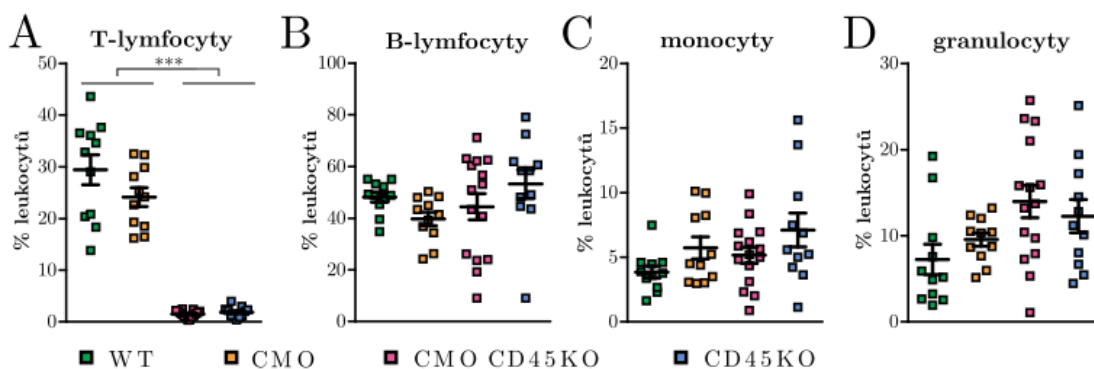
U CMO i CMO CD45KO byly mírně zvýšeny relativní četnost i absolutní počet makrofágů, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný (obrázek 8F). Relativní četnost a absolutní počet granulocytů se mezi modely výrazně nelišily (obrázek 8G).



Obrázek 8: Zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk ve slezině. (A) Celularita sleziny. (B-G) Graf vlevo vždy znázorňuje relativní četnost, graf vpravo absolutní počty daného typu imunitních buněk.

### 5.1.3 Krev

U obou CD45 deficientních modelů nebyly v krvi zastoupeny téměř žádné T-lymfocyty (obrázek 9A). Zastoupení ostatních měřených typů imunitních buněk (monocytů, granulocytů a B-lymfocytů) se mezi jednotlivými modely významně nelišilo (obrázek 9B–D). Zvýšení relativní četnosti granulocytů bylo u obou CD45 deficientních modelů pouze mírné (obrázek 9D).



Obrázek 9: Zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk v krvi.

Z výsledků analýzy zastoupení jednotlivých typů imunitních buněk v kostní dřeni, slezině a krvi vyplývá, že výskyt T-lymfocytů je závislý na expresi CD45. Jejich nižší zastoupení vede ke zvýšení relativní četnosti jiných buněčných populací. Zdá se, že vyšší absolutní množství monocytů a granulocytů v kostní dřeni je u CMO regulováno fosfatázou CD45. Naproti tomu je u CMO mírně zvýšené množství makrofágů na expresi CD45 nezávislé.

Z výsledků také vyplývá, že zastoupení CMP a GMP v kostní dřeni je regulováno fosfatázou CD45 nezávisle na deficienci PSTPIP2. U CMO je však pravděpodobně touto fosfatázou nebo SFK regulováno množství MEP.

## 5.2 Fosforylace kináz rodiny Src

Fosforylace aktivačního a inhibičního tyrozinu SFK byla sledována u nestimulovaných buněk a v různých časových bodech po aktivaci buněk silikou. Experimenty byly provedeny na celé kostní dřeni a poté na purifikovaných neutrofilních granulocytech.

### 5.2.1 Inhibiční tyrozin

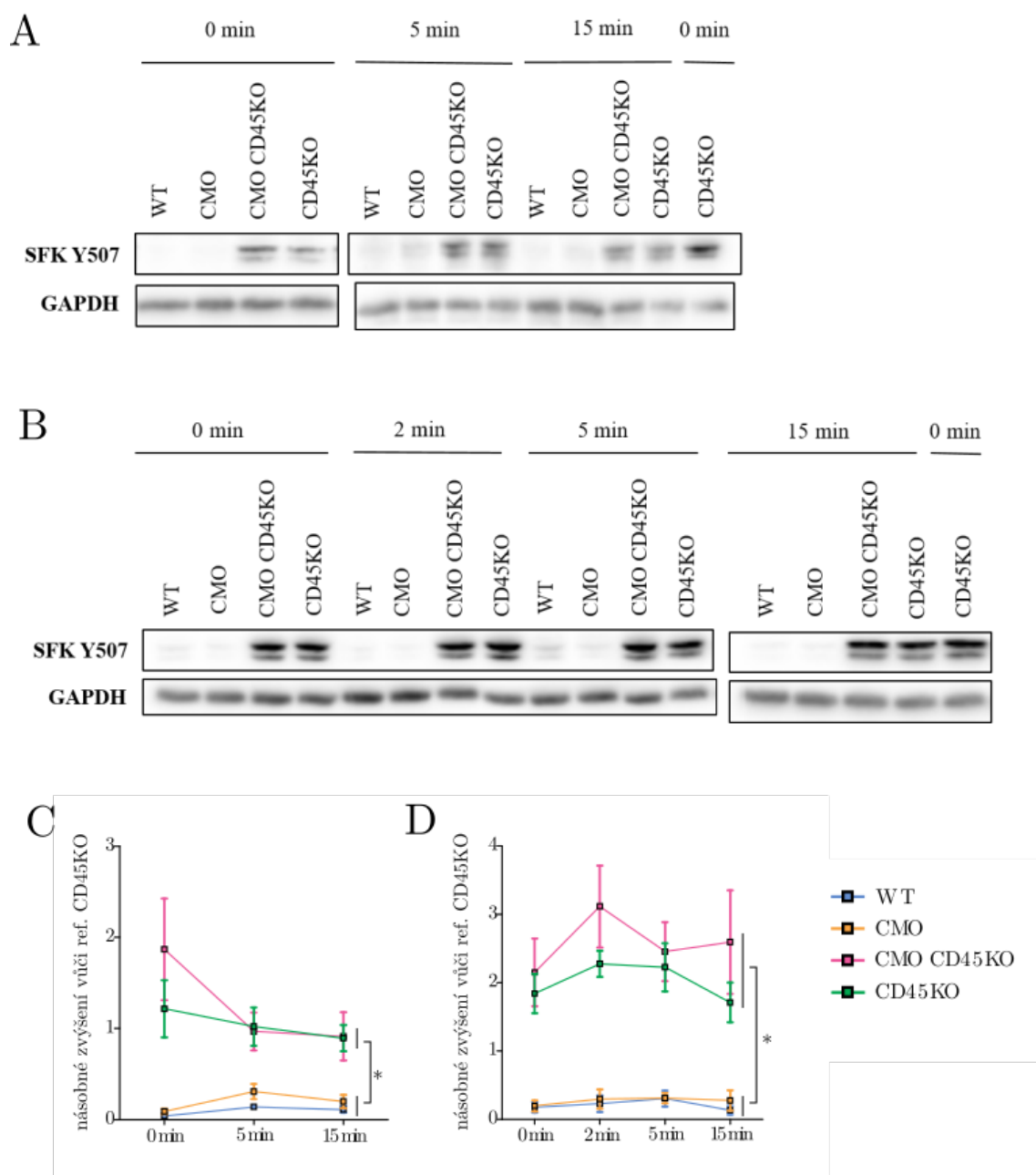
Fosforylace inhibičního tyrozinu byla detekována protilátkou Phospho-Lyn (Tyr507), *Cell Signaling Technology*, která podle výrobce kromě LYN zkříženě reaguje i s dalšími SFK, které mají fosforylovaný inhibiční tyrozin.

Podle předpokladu oba CD45 deficientní modely vykazovaly výrazně vyšší fosforylaci inhibičního tyrozinu SFK v klidovém stavu i po aktivaci buněk silikou. Fosforylace tohoto tyrozinu se v rámci každého modelu v různých časových bodech aktivace výrazně neměnila, změny byly pouze mírné (obrázek 10A, C).

Výsledky získané aktivací purifikovaných granulocytů kopírují výsledky získané aktivací kostní dřeni. U obou CD45 deficientních modelů byla u nestimulovaných buněk i po aktivaci buněk silikou fosforylace inhibičního tyrozinu výrazně zvýšena, dokonce ještě více než u celkové kostní dřeni. Tato fosforylace se však v různých časových bodech u žádného z modelů výrazně neměnila. Změny byly pouze mírné (obrázek 10B, D).

V důsledku deficiencie CD45 dochází k vyšší fosforylaci inhibičního tyrozinu u CD45KO i CMO CD45KO. V absenci CD45 nedochází k defosforylaci tohoto tyrozinu [45, 46]. SFK proto pravděpodobně u obou CD45 deficientních modelů zaujímají neaktivní uzavřenou konformaci. Lze tedy předpokládat, že aktivita SFK bude u CMO CD45KO nižší než u CMO.





Obrázek 10: **Fosforylace inhibičního tyrozinu SFK.** (A) Fosforylace inhibičního tyrozinu SFK po aktivaci celkové kostní dřeně. (B) Fosforylace inhibičního tyrozinu SFK po aktivaci purifikovaných granulocytů. (C) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v A. (D) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v B.

### 5.2.2 Aktivační tyrozin

K detekci fosforylace aktivačního tyrozinu byla použita protilátka Phospho-Src Family (Tyr416), *Cell Signaling Technology*, která zkříženě reaguje s fosforylovaným aktivačním tyrozinem všech SFK.

Výsledky získané aktivací celkové kostní dřeně zprvu neodhalily žádné výrazné rozdíly mezi jednotlivými modely. Celková fosforylace aktivačních tyrozinů SFK nebyla mezi jednotlivými modely v klidovém stavu ani v různých časových bodech aktivace výrazně rozdílná. V rámci každého modelu se tato fosforylace v různých časových bodech aktivace podstatně neměnila. Nicméně po 5 minutách aktivace byl patrný mírný pokles této fosforylace (obrázek 11A, C).

U obou CD45 deficientních modelů byla pozorovatelná změna v profilu intenzit této fosforylace (obrázek 11A). Následná analýza jednotlivých pásů ukázala výrazný rozdíl mezi WT a CMO CD45KO ve fosforylaci středního pásu po 30 minutách aktivace. Další rozdíly mezi jednotlivými modely ani rozdíly mezi jednotlivými časovými body v rámci jednoho modelu nebyly výrazné (obrázek 12A).

Jelikož byl u CMO a WT po 5 minutách aktivace buněk celkové kostní dřeně pozorován mírný pokles celkové fosforylace aktivačního tyrozinu SFK (obrázek 11C) a zároveň mírný nárůst fosforylace inhibičního tyrozinu SFK (obrázek 10C) ve srovnání s klidovým stavem, zdá se, že v tomto časovém bodě byla aktivita SFK oproti klidovému stavu snížena. Je tedy otázkou, jestli nedochází k fosforylaci aktivačního tyrozinu SFK již dříve po aktivaci a k jeho následné defosforylaci a současně fosforylaci inhibičního tyrozinu za účelem zastavení další signalizace. Proto byla u purifikovaných granulocytů sledována fosforylace aktivačního tyrozinu SFK již po 2 minutách aktivace.

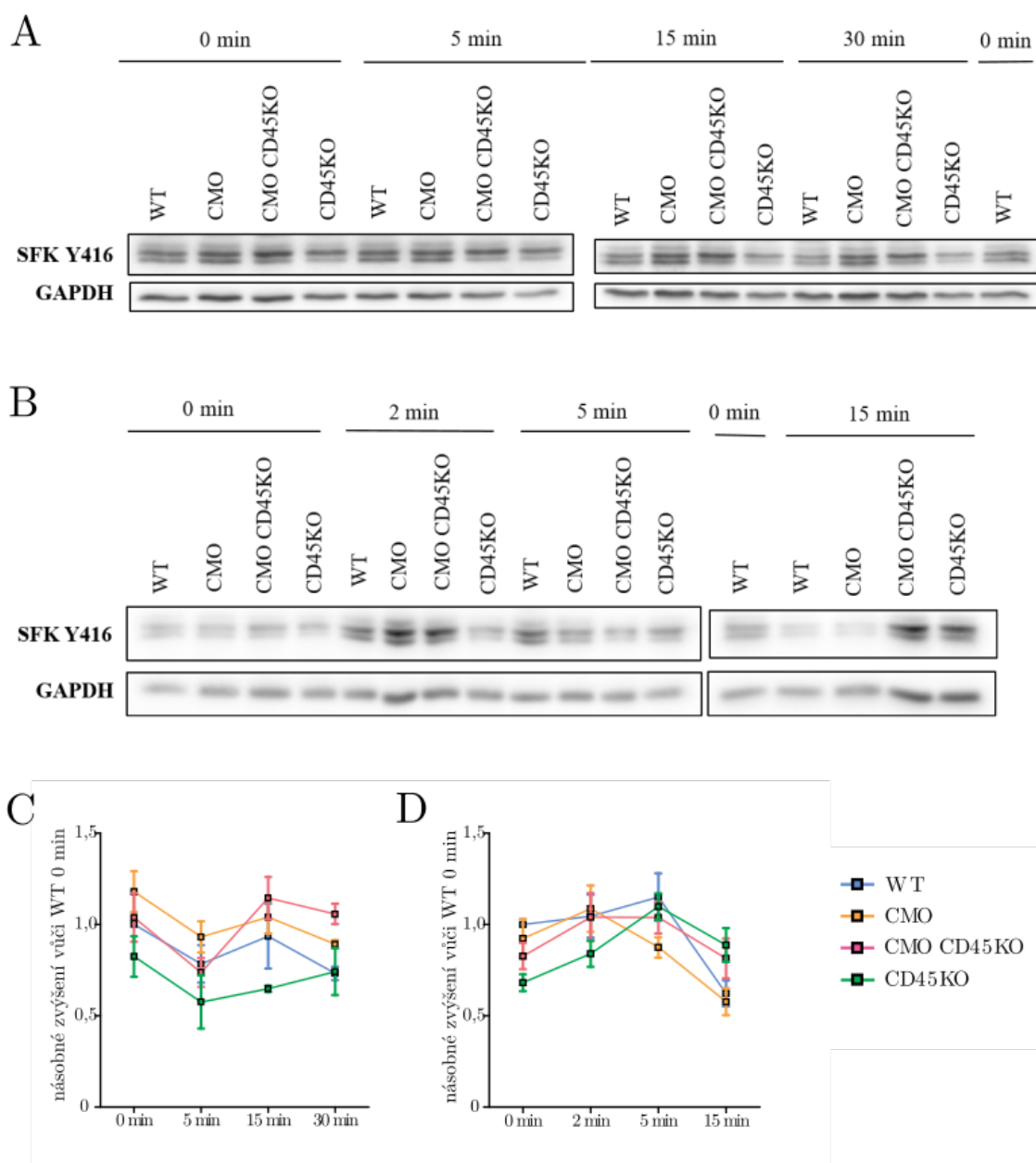
Výsledky získané aktivací purifikovaných granulocytů ukázaly, že u CMO a CMO CD45KO je fosforylace aktivačního tyrozinu skutečně nejvyšší již po dvou minutách aktivace, zatímco u WT a CD45KO dosahuje nejvyšší hodnoty po 5 minutách aktivace. Překvapivě nebyl po 5 minutách aktivace patrný mírný pokles této fosforylace ve srovnání s klidovým stavem pozorovaný u celkové kostní dřeně. Minimálně u WT a CD45KO se proto nezdá, že by u neutrofilních granulocytů po 5 minutách aktivace docházelo k defosforylaci aktivačního tyrozinu a zastavení další signalizace řízené SFK.

Ačkoliv se u jednotlivých modelů mírně lišila kinetika fosforylace aktivačního tyrozinu, rozdíly v rámci každého modelu v různých časových bodech aktivace nebyly výrazné.

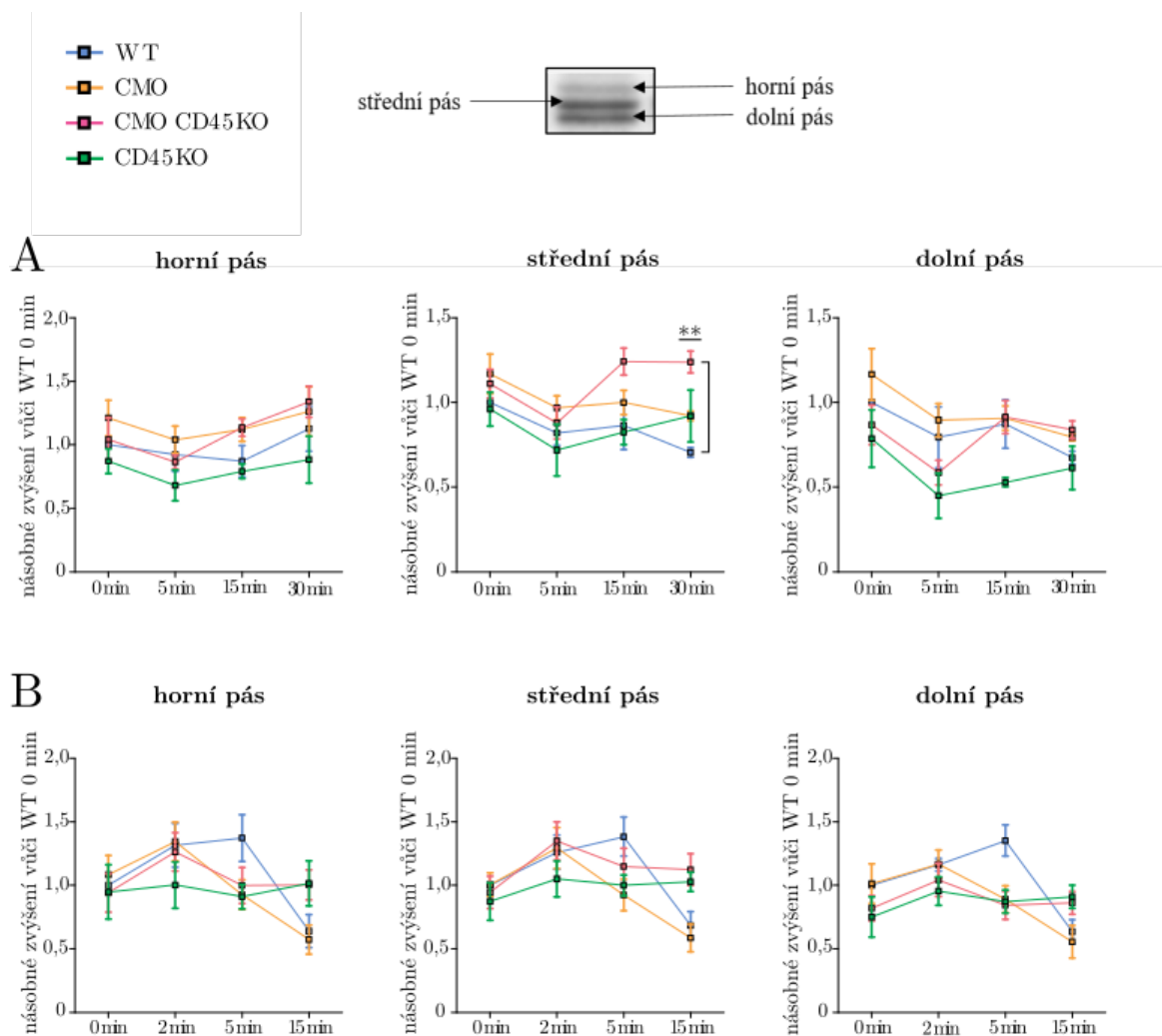
Stejně tak fosforylace aktivačních tyrozinů SFK se mezi jednotlivými modely v klidovém stavu ani po aktivaci v různých časových bodech výrazně nelišila (obrázek 11B, D).

Stejně jako u celkové kostní dřeně byla u obou CD45 deficientních modelů pozorovatelná změna v profilu intenzit fosforylace aktivačních tyrozinů SFK (obrázek 11B). Nicméně analýza jednotlivých pásů v tomto případě neukázala výrazné rozdíly mezi modely ani mezi jednotlivými časovými body v rámci jednoho modelu. U kostní dřeně byl však pozorovaný rozdíl až po 30 minutách aktivace a aktivace neutrofilních granulocytů po dobu 30 minut nebyla provedena. Podobně jako v případě kostní dřeně však byla patrná mírně rozdílná kinetika fosforylace jednotlivých pásů mezi jednotlivými modely (obrázek 12B).

Tyto výsledky naznačují, že u CMO a CMO CD45KO dochází k dřívější fosforylaci aktivačního tyrozinu SFK. Dále deficiencie CD45 vede ke změně v profilu intenzit této fosforylace. Změna v profilu intenzit může být způsobená odlišnou poměrnou fosforylací jednotlivých SFK. Analýza fosforylace jednotlivých pásů však tuto teorii příliš nepodporuje, protože ukázala výrazný rozdíl pouze u středního pásu po 30 minutách aktivace kostní dřeně mezi WT a CMO CD45KO.



Obrázek 11: **Fosforylace aktivačního tyrozínu SFK.** (A) Fosforylace aktivačního tyrozínu SFK po aktivaci celkové kostní dřeně. (B) Fosforylace aktivačního tyrozínu SFK po aktivaci purifikovaných granulocytů. (C) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v A. (D) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v B.



Obrázek 12: Fosforylace jednotlivých pásů v profilu intenzit fosforylace aktivního tyrozinu SFK. (A) Celková kostní dřeň - vyhodnocení několika experimentů provedených jako je zobrazeno na obrázku 11A. (B) Purifikované granulocyty - vyhodnocení několika experimentů provedených jako je zobrazeno na obrázku 11B.

## 5.3 Vybrané signální dráhy deregulované u CMO myší

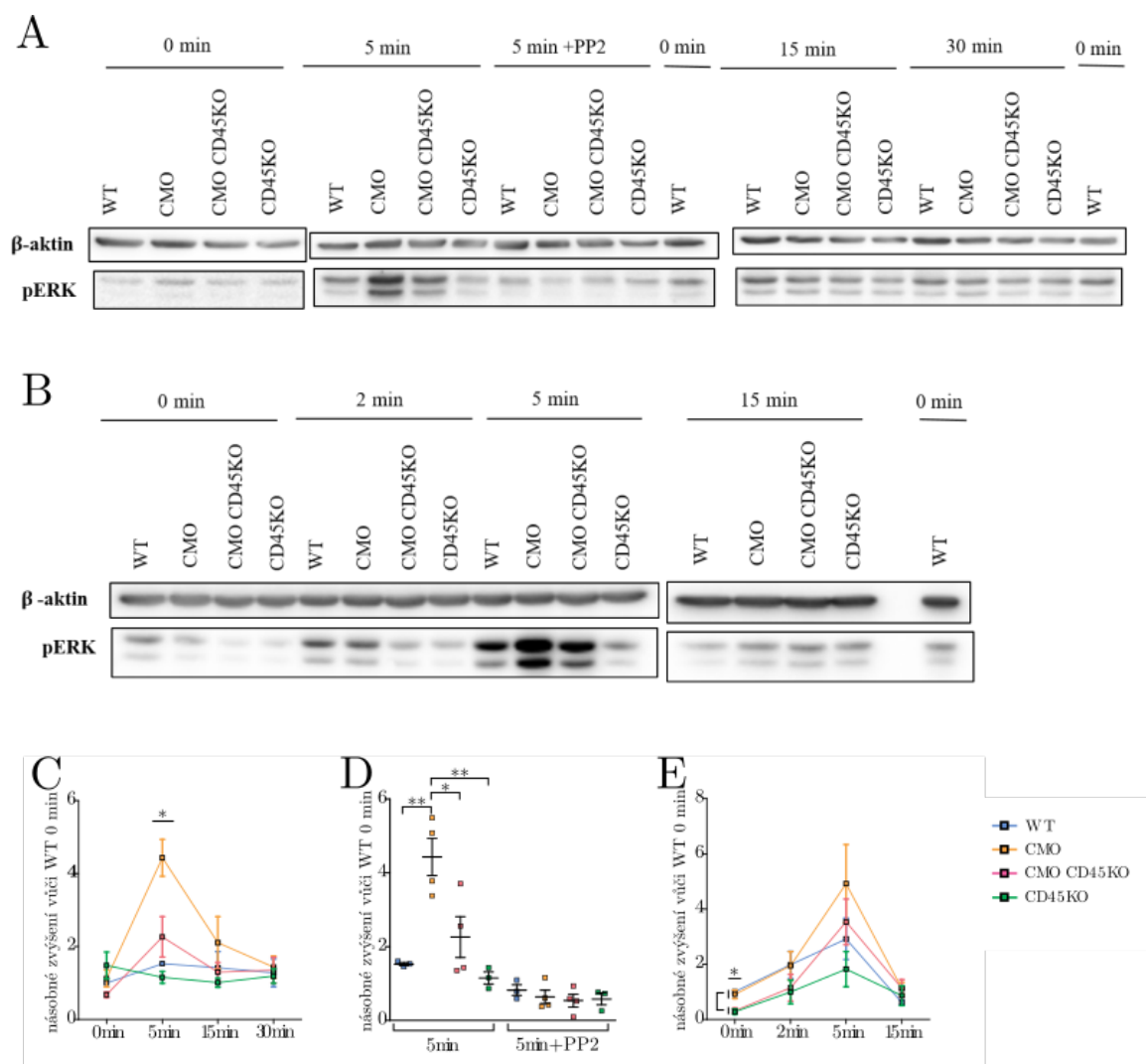
V rámci diplomové práce byla v klidovém stavu a v různých časových intervalech po aktivaci silikou studována fosforylace MAP kinázy ERK, která je u CMO po aktivaci silikou zvýšená [4]. Studována byla také produkce IL-1 $\beta$ , jejíž zvýšení je nezbytné pro rozvoj onemocnění [26, 27]. V obou případech byla sledována závislost deregulace těchto drah na aktivitě SFK. K tomu byl využit inhibitor SFK – PP2 [7]. Experimenty byly provedeny na celé kostní dřeni a poté na purifikovaných neutrofilních granulocytech.

### 5.3.1 Fosforylace MAP kinázy ERK

V případě celkové kostní dřene nebyly mezi jednotlivými modely u nestimulovaných buněk výrazné rozdíly ve fosforylaci MAP kinázy ERK. Po 5 minutách aktivace došlo ke zvýšení této fosforylace. Ta byla u CMO ve srovnání s ostatními modely výrazně zvýšena. Po 15 minutách aktivace se u všech modelů fosforylace ERK vrátila zpět na úroveň klidové fosforylace (obrázek 13A, C). V přítomnosti inhibitoru PP2 nedošlo k nárůstu fosforylace ERK po aktivaci buněk silikou. Tato fosforylace se u všech modelů držela na úrovni klidové fosforylace (obrázek 13A, D).

V případě purifikovaných granulocytů byla u nestimulovaných buněk u obou CD45 deficientních modelů pozorovatelná podstatně snížená fosforylace kinázy ERK (obrázek 13B, E). Po aktivaci buněk silikou došlo u všech modelů ke zvýšení této fosforylace. Deficience CD45 tedy neovlivnila nárůst této fosforylace ve srovnání s WT. Nejvíce byla fosforylace ERK zvýšená po 5 minutách aktivace silikou stejně jako při aktivaci buněk celkové kostní dřene. Na rozdíl od buněk celkové kostní dřene byla v případě purifikovaných granulocytů v tomto časovém bodě fosforylace ERK u CMO oproti ostatním modelům pouze mírně zvýšená, nejednalo se o statisticky významný rozdíl. Po 15 minutách aktivace se fosforylace ERK vracela na úroveň klidové fosforylace (obrázek 13B, E).

Tyto výsledky ukázaly, že CD45 a SFK regulují fosforylaci ERK v buňkách kostní dřene CMO. Po aktivaci buněk silikou je fosforylace MAP kinázy ERK závislá na aktivitě SFK.



Obrázek 13: **Fosforylace MAP kinázy ERK.** (A) Fosforylace ERK po aktivaci celkové kostní dřeně. (B) Fosforylace ERK po aktivaci purifikovaných granulocytů. (C-D) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v A. (E) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v B.

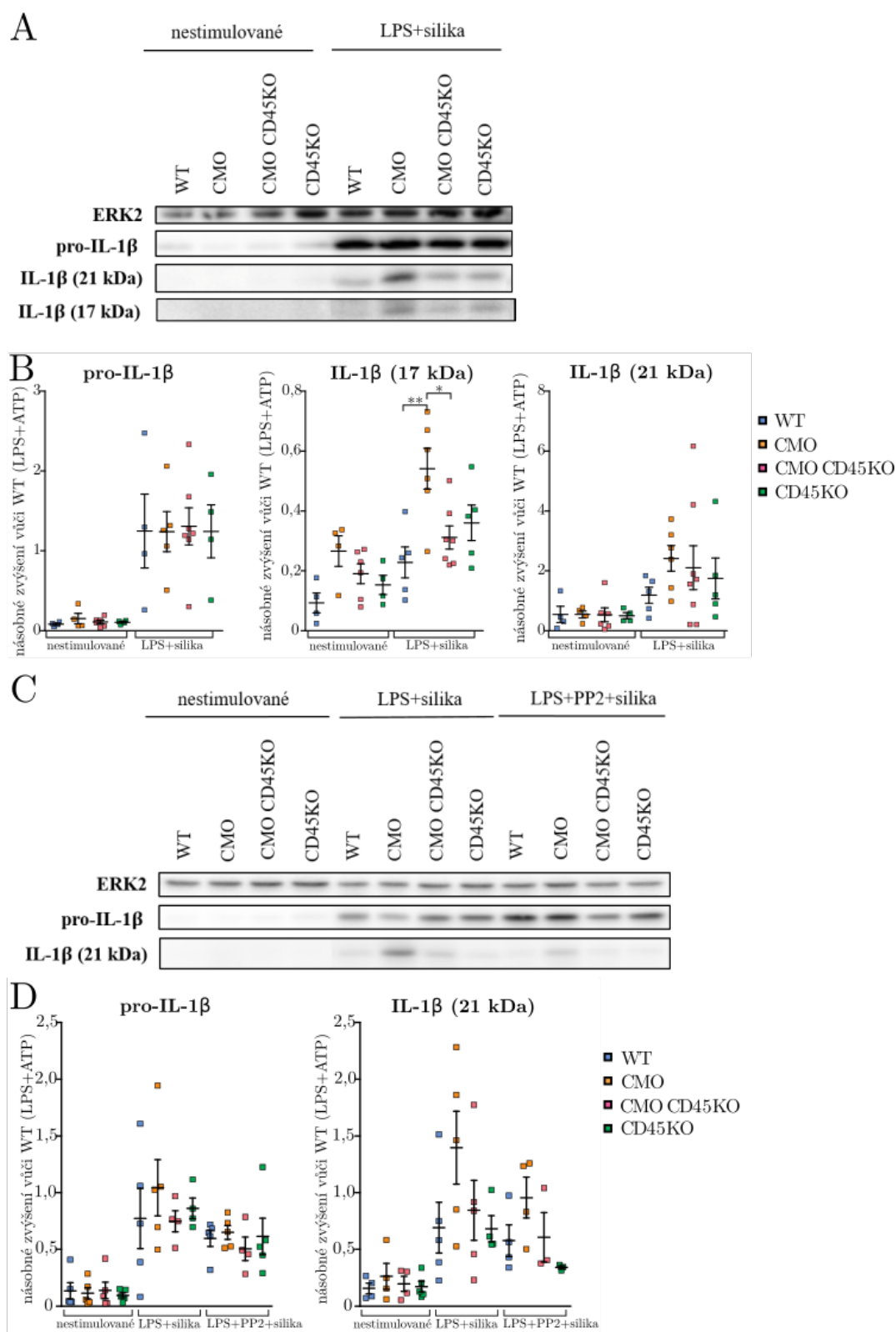
### 5.3.2 Produkce IL-1 $\beta$

V případě celkové kostní dřeně nebyly v klidovém stavu mezi jednotlivými modely rozdíly v produkci pro-IL-1 $\beta$  ani v jeho štěpení na IL-1 $\beta$ . Po stimulaci buněk LPS došlo k výraznému zvýšení produkce pro-IL-1 $\beta$  a po následné aktivaci buněk silikou k jeho štěpení na IL-1 $\beta$ . Mezi jednotlivými modely nebyly pozorovány rozdíly v produkci pro-IL-1 $\beta$ . Nicméně u CMO došlo k výrazně větší produkci štěpeného IL-1 $\beta$  o velikosti 17 kDa. Tento trend byl pozorovatelný i u množství štěpeného IL-1 $\beta$  o velikosti 21 kDa, avšak rozdíl v jeho produkci nebyl statisticky významný (obrázek 14A, B).

V případě purifikovaných granulocytů také nebyly v klidovém stavu mezi jednotlivými modely rozdíly v produkci pro-IL-1 $\beta$  ani v jeho štěpení na IL-1 $\beta$ . Po stimulaci buněk LPS došlo k zahájení produkce pro-IL-1 $\beta$  a po následné aktivaci buněk silikou k jeho štěpení na IL-1 $\beta$ . Mezi jednotlivými modely nebyly pozorovány rozdíly v produkci pro-IL-1 $\beta$  stejně jako v případě celkové kostní dřeně. Nepodařilo se však detekovat štěpený IL-1 $\beta$  o velikosti 17 kDa. Nicméně u CMO došlo k vyšší produkci štěpeného IL-1 $\beta$  o velikosti 21 kDa. Tento rozdíl však, stejně jako v případě kostní dřeně, nebyl statisticky významný. V případě purifikovaných granulocytů bylo také studováno štěpení IL-1 $\beta$  za přítomnosti inhibitoru PP2. Přítomnost PP2 vedla k výrazně nižší produkci štěpeného IL-1 $\beta$  u CMO, snížení produkce štěpeného IL-1 $\beta$  bylo u ostatních modelů jen mírné (obrázek 14C, D).

Tyto výsledky ukázaly, že CD45 reguluje štěpení IL-1 $\beta$  v kostní dřeni CMO. Zvýšené štěpení IL-1 $\beta$  u CMO je pravděpodobně způsobeno deregulací SFK nebo dráhy, která je na SFK závislá.





Obrázek 14: **Produkce IL-1 $\beta$ .** (A) Produkce IL-1 $\beta$  – celková kostní dřeň. (B) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v A. (C) Produkce IL-1 $\beta$  – purifikované granulocyty. (D) Vyhodnocení několika experimentů provedených jako v C.

## 6 Diskuze

První část diplomové práce se zabývala analýzou a porovnáním zastoupení vybraných typů imunitních buněk v kostní dřeni, slezině a krvi u jednotlivých myších modelů – WT, CMO, CMO CD45KO a CD45KO. Hlavním cílem této části bylo charakterizovat model CMO CD45KO a zjistit, jak kopíruje fenotyp CMO či CD45KO, a odhalit, jestli je odlišné zastoupení některých typů imunitních buněk u CMO ve srovnání s WT závislé na aktivitě CD45, případně způsobeno deregulací SFK. K experimentům byly použity asymptomatické myši ve věku 5–7 týdnů, tj. u CMO krátce před prvním projevem viditelných příznaků onemocnění (viz obrázek 4A).

Počty buněk ve slezině CMO myší byly oproti ostatním modelům mírně vyšší, avšak statisticky nevýznamně. To odpovídá tomu, že u CMO myší byla v pozdějším věku zaznamenána splenomegalie a extramedulární krvetvorba [2, 22]. Velikost sleziny však nebyla v rámci diplomové práce posuzována. Stejně tak nebylo sledováno množství buněk ve slezině ani velikost sleziny u myší v pozdějším věku.

U obou CD45 deficientních modelů bylo pozorováno velmi malé zastoupení T-lymfocytů. To je v souladu s tím, že CD45 je důležitá pro signalizaci přes T-receptor [59, 60] a vývoj T-lymfocytů [61]. Nicméně rozvoj onemocnění u CMO myší je na T- i B-lymfocytech nezávislý [22]. Jedná se o onemocnění řízené přirozenou imunitou, především neutrofilními granulocyty [25]. Absence T-lymfocytů u CMO CD45KO myší by proto neměla mít na rozvoj onemocnění vliv.

Podobně mírně nižší počet B-lymfocytů v kostní dřeni CMO myší, který nebyl ve srovnání s CMO CD45KO statisticky významný, a zvýšení relativní četnosti B-lymfocytů (z důvodu nižšího zastoupení T-lymfocytů) ve slezině obou CD45 deficientních modelů pravděpodobně neovlivňuje rozvoj onemocnění. Nízké zastoupení T-lymfocytů u obou CD45 deficientních modelů vedlo ke zvýšení relativních četností i dalších buněčných populací. V případě dendritických buněk ve slezině a kostní dřeni a monocytů ve slezině však byly zvýšeny i jejich absolutní počty. Zvýšené množství dendritických buněk ve slezině CD45KO je v souladu s již dříve publikovanou studií [67].

Fenotyp CMO CD45KO kopíroval mírně vyšším, avšak statisticky nevýznamným, zastoupením makrofágů ve slezině i kostní dřeni fenotyp CMO. Zvýšený počet makrofágů ve slezině je v souladu s předchozími pozorováními u symptomatických CMO myší [22, 24].

Podobně byla u CMO myší popsána vyšší infiltrace postižené tkáně makrofágy [22, 23]. Jelikož bylo zvýšené množství makrofágů pozorováno u CMO i CMO CD45KO myší, jedná se o fenotypový znak CMO myší, který není závislý na aktivitě CD45 ani SFK. Jakou roli však hrají makrofágy v rozvoji a průběhu onemocnění není dosud zcela objasněno.

V kostní dřeni CMO myší byl ve srovnání s ostatními myšími modely výrazně zvýšen absolutní počet monocytů. Pro experimenty, při kterých jsou stimulovány buňky celkové kostní dřene, je důležitá relativní četnost jednotlivých buněčných typů. Relativní četnost monocytů v kostní dřeni byla jen mírně, statisticky nevýznamně, rozdílná. Přesto je však toto pozorování vhodné zohlednit, jelikož monocyty po aktivaci stejně jako granulocyty například také produkují IL-1 $\beta$  a jejich vyšší zastoupení tak mohlo zvětšit rozdíl mezi CMO a ostatními modely.

Podobně byl v kostní dřeni CMO myší výrazně zvýšen absolutní počet granulocytů. Jejich relativní četnost však byla srovnatelná s CMO CD45KO. Z těchto výsledků vyplývá, že zvýšení absolutního počtu granulocytů a monocytů v kostní dřeni u CMO myší je závislé na aktivitě CD45, nebo způsobeno deregulací SFK.

Jelikož je onemocnění u CMO myší řízeno přirozenou imunitou [22], především neutrofilními granulocyty [25], zvýšení absolutního počtu granulocytů a monocytů v kostní dřeni nejspíše hraje určitou roli v rozvoji tohoto onemocnění. Předchozí výzkumy odhalily vyšší migraci myeloidních buněk do míst probíhajícího zánětu a okolí postižené tkáně [2, 23, 22]. Zároveň byla u symptomatických CMO myší pozorována vyšší infiltrace sleziny nejen dříve zmíněnými makrofágy, ale též monocyty a granulocyty [24].

V rámci této diplomové práce byla kostní dřev izolována z asymptomatických myší ve věku 5–7 týdnů. U CMO je to krátce před prvním projevem viditelných symptomů. Je tedy pravděpodobné, že tento navýšený počet granulocytů a monocytů v kostní dřeni koreluje s rozvojem onemocnění a migrací těchto buněk do postižené tkáně. Nižší počet granulocytů a monocytů u CMO CD45KO ve srovnání s CMO by tak mohl souviset s pozdějším nástupem onemocnění u těchto myší. Zůstává však nezodpovězena otázka, jestli u CMO CD45KO myší nedochází k navýšení počtu monocytů a granulocytů v pozdějším věku. Množství granulocytů a monocytů u starších CMO CD45KO myší však nebylo v rámci této diplomové práce sledováno.

Ačkoliv je onemocnění u CMO řízeno přirozenou imunitou [22], především neutrofilními granulocyty [25], nebylo dosud u CMO myší studováno zastoupení jednotlivých typů

myeloidních progenitorů v kostní dřeni. Byla pouze studována extramedulární krvetvorba ve slezině [24]. Absolutní počet LSK v kostní dřeni CMO myši byl ve srovnání s WT mírně, avšak statisticky nevýznamně, zvýšen a naopak množství MEP bylo mírně, statisticky nevýznamně, sníženo. Množství CMP a GMP, ze kterých vznikají hlavní linie myeloidních buněk, bylo u CMO a WT myši srovnatelné. K navýšení počtu granulocytů u CMO myši tedy nepřispívá vyšší počet GMP, ale dochází k němu až v dalších stádiích vývoje, nebo nějakým jiným mechanismem, který není závislý na jejich produkci v kostní dřeni.

Fenotyp CMO CD45KO kopíroval fenotyp CD45KO – mírné zvýšení množství LSK (podobně jako u CMO) a CMP, množství MEP srovnatelné s WT a statisticky významné snížení GMP. Z těchto výsledků vyplývá, že množství CMP a GMP v kostní dřeni je závislé na aktivitě CD45. Snížený počet GMP u obou CD45 deficientních modelů by mohl být příčinou nižšího počtu granulocytů v kostní dřeni u CD45KO myši. Zároveň by tento snížený počet GMP mohl být důvodem, proč u CMO CD45KO nedochází ke zvýšení počtu granulocytů v kostní dřeni ve srovnání s CMO. Nicméně, jak už bylo zmíněno dříve, u CMO CD45KO dochází k rozvoji onemocnění později než u CMO a nevíme, jestli k navýšení počtu granulocytů nedochází u těchto myši v pozdějším věku krátce před výskytem prvních viditelných příznaků onemocnění.

Druhá část diplomové práce se zabývala aktivací celkové kostní dřene a následně purifikovaných granulocytů izolovaných z jednotlivých modelů a zaměřovala se na fosforylaci SFK, fosforylaci MAP kinázy ERK, která je aktivitou SFK regulována [74, 75, 76], a produkci IL-1 $\beta$ . Protože je rozvoj onemocnění částečně závislý na NLRP3 inflamazomu [25, 28], ke stimulaci buněk byla používána silika, která NLRP3 inflamazom aktivuje [77].

Podle předpokladu byla u CD45KO a CMO CD45KO výrazně zvýšena fosforylace inhibičního tyrozinu. Při absenci CD45 nedochází k defosforylaci tohoto tyrozinu [45, 46], SFK zaujímají uzavřenou enzymaticky neaktivní konformaci [78, 79]. U CD45KO je nižší aktivita SFK předpokládána na základě toho, že je zastaven vývoj T-lymfocytů z důvodu narušené signalizace přes T-receptor [62]. Tento předpoklad podporuje skutečnost, že u LCK deficientních myši je vývoj T-lymfocytů taktéž zastaven [64]. Dále lze nižší aktivitu SFK u CD45KO předpokládat na základě toho, že CD45 deficientní neutrofilní granulocyty kopírují fenotyp neutrofilních granulocytů deficientních v SFK [51]. Na základě zvýšené fosforylace inhibičního tyrozinu také u CMO CD45KO lze u tohoto modelu předpokládat

sníženou aktivitu SFK stejně jako u CD45KO. Aktivita SFK u CMO CD45KO bude tedy pravděpodobně nižší než u CMO.

Změny ve fosforylaci inhibičního i aktivačního tyrozinu byly v průběhu aktivace buněk v rámci každého modelu pouze mírné. Zdá se tedy, že aktivita SFK se podstatně neměnila. Nicméně u kostní dřeně byl po 5 minutách pozorovatelný mírný nárůst fosforylace inhibičního tyrozinu u WT a CMO a mírný pokles fosforylace aktivačního tyrozinu u všech modelů. Toto pozorování by mohlo naznačovat inhibici SFK v tomto časovém bodě, která vede k zabránění další signalizace, a tím zamezení zvýšené aktivace buněk. Tuto teorii však příliš nepodporuje pozorování, že u purifikovaných granulocytů nebylo zvýšení fosforylace inhibičního tyrozinu po 5 minutách aktivace buněk tolik patrné a zároveň nedošlo ke snížení fosforylace aktivačního tyrozinu. Naopak u WT byla v tomto časovém bodě fosforylace aktivačního tyrozinu SFK nejvyšší. Nicméně u CMO a CMO CD45KO došlo k nárůstu fosforylace aktivačního tyrozinu již po 2 minutách aktivace. Ačkoliv byly rozdíly ve fosforylaci aktivačního tyrozinu mezi jednotlivými modely v každém časovém bodě pouze mírné, statisticky nevýznamné, tento rychlejší nárůst fosforylace aktivačního tyrozinu SFK u CMO a CMO CD45KO by mohl vysvětlovat snadnější a vyšší aktivaci neutrofilů u CMO [4, 26, 31, 33], která není závislá na aktivitě CD45.

Deficience CD45 způsobila změnu v profilu intenzit fosforylace aktivačního tyrozinu. Ta může být způsobená odlišnou poměrnou fosforylací jednotlivých SFK. Analýza jednotlivých pásů tuto teorii spíše nepotvrdila, jelikož výrazný rozdíl byl pozorovaný pouze u středního pásu po 30 minutách aktivace buněk kostní dřeně mezi WT a CMO CD45KO. Mohlo by to však naznačovat, že dvojitá deficience PSTPIP2 a CD45 vedla k selektivně vyšší aktivitě některé SFK po 30 minutách aktivace buněk silikou.

Kromě fosforylace SFK byla po aktivaci buněk silikou sledována také fosforylace MAP kinázy ERK, která je závislá na aktivitě SFK [74, 75, 76]. Podle předchozích studií je tato fosforylace u CMO ve srovnání s WT zvýšena [4, 24]. V souladu s tím byla i v rámci této diplomové práce po 5 minutách aktivace pozorována výrazně zvýšená fosforylace ERK u CMO ve srovnání s ostatními modely. Deficience CD45 u CMO modelu zabránila výraznému zvýšení fosforylace ERK. Podobný trend byl pozorován i u purifikovaných granulocytů, nicméně se nejednalo o statisticky významný rozdíl. Výraznější rozdíl v případě kostní dřeně mohl být dán mírně vyšším zastoupením granulocytů a monocytů v kostní dřeni u CMO. Případně mohl být menší rozdíl ve fosforylaci ERK u purifikovaných granu-

locytů způsoben zvýšenou manipulací s těmito snadno aktivovatelnými buňkami, kterou proces purifikace vyžaduje.

Závislost fosforylace ERK na aktivitě SFK byla potvrzena s využitím inhibitoru SFK – PP2. Za přítomnosti PP2 nedocházelo po 5 minutách aktivace k fosforylaci ERK. Z výsledků vyplývá, že u CMO CD45KO nedochází ke zvýšené fosforylaci ERK pravděpodobně v důsledku nižší aktivity SFK.

Poslední, avšak v případě CMO velmi důležitou, oblastí studia byla produkce IL-1 $\beta$ . Výsledky experimentů provedených v rámci diplomové práce ukázaly v souladu s předchozími studiemi výrazně zvýšenou produkci IL-1 $\beta$  u CMO ve srovnání s ostatními modely [4, 26, 27]. Deficience CD45 u CMO modelu vedla k výraznému snížení produkce IL-1 $\beta$  po aktivaci buněk celkové kostní dřeně. Produkce pro-IL-1 $\beta$  se však nelišila. Stejný trend byl pozorovaný po aktivaci purifikovaných granulocytů. Rozdíl v množství štěpeného IL-1 $\beta$  však nebyl statisticky významný. Stejně jako v případě fosforylace MAP kinázy ERK mohl být výraznější rozdíl u buněk celkové kostní dřeně dán mírně vyšším zastoupením granulocytů a monocytů v kostní dřeni u CMO, nebo tím, že v případě celkové kostní dřeně bylo s buňkami méně manipulováno. U purifikovaných granulocytů se nepodařilo detekovat štěpený IL-1 $\beta$  o velikosti 17 kDa. To mohlo být rovněž způsobeno citlivostí těchto buněk a zvýšenou manipulací s nimi, kterou proces purifikace vyžaduje.

Závislost štěpení IL-1 $\beta$  na aktivitě SFK byla studována s využitím inhibitoru PP2. Za přítomnosti tohoto inhibitoru se produkce IL-1 $\beta$  výrazně snížila především u CMO. U ostatních modelů bylo snížení produkce IL-1 $\beta$  velmi mírné a nelze mu přikládat velký význam. Tato skutečnost naznačuje deregulaci SFK u CMO (pravděpodobně jejich vyšší aktivitu) vedoucí ke zvýšené produkci IL-1 $\beta$ . Deficience CD45 je schopna této zvýšené aktivity SFK předejít, a proto u CMO CD45KO nedocházelo po aktivaci ke zvýšené produkci IL-1 $\beta$ .

Jelikož deficience kinázy SYK u CMO brání rozvoji onemocnění [33], je pravděpodobné, že SFK jsou do tohoto procesu zapojeny. Kináza SYK se totiž váže na ITAM motivy, které jsou fosforylované SFK, shrnuto v [80]. Rovněž bylo zjištěno, že v megakaryocytech PSTPIP2 interaguje s LYN [81]. Jestli PSTPIP2 interaguje i s dalšími SFK a jestli k této interakci dochází i v neutrofilních granulocytech, však nebylo studováno. Zapojení SFK do rozvoje onemocnění u CMO dále podporuje skutečnost, že PSTPIP2 interaguje s kinázou CSK a PEST fosfatázami, které aktivitu SFK regulují [4, 3]. Je tedy pravděpodobné,

že současná interakce LYN, CSK a PEST fosfatáz vede k inhibici aktivity této kinázy. Nicméně role SFK a CD45 v rozvoji onemocnění u CMO myší nebyla dosud studována.

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že CD45 a SFK jsou zapojeny do některých procesů vedoucích u CMO myší k rozvoji onemocnění, např. zvýšené fosforylaci MAP kinázy ERK. Některé procesy doprovázející rozvoj onemocnění u CMO jsou však na aktivitě CD45 a SFK nezávislé. Rozvoj onemocnění je řízen zvýšenou produkcí IL-1 $\beta$  [26]. Nižší produkce IL-1 $\beta$  u modelu CMO CD45KO, u kterého je snížena aktivita SFK, a skutečnost, že přítomnost inhibitoru SFK – PP2 vede ke snížení produkce štěpeného IL-1 $\beta$  u CMO modelu zatímco u ostatních modelů nedochází k podstatnému snížení štěpení tohoto cytokinu, naznačuje, že deregulace SFK (pravděpodobně jejich vyšší aktivita) u CMO modelu vede k vyšší produkci IL-1 $\beta$  a rozvoji onemocnění. Je však možné i alternativní vysvětlení, že PSTPIP2 reguluje produkci IL-1 $\beta$  a další procesy závislé na aktivitě SFK jiným mechanismem, který tyto kinázy přímo neovlivňuje, a do signální kaskády zasahuje v pozdějším kroku než je aktivace SFK. I v takovém případě by totiž inhibice SFK vedla k utlumení těchto deregulovaných drah a zmírnění následků absence PSTPIP2. Jakým způsobem jsou tedy SFK u CMO myší zapojeny do produkce IL-1 $\beta$ , jaká je jejich přesná aktivita a jestli v tomto procesu některá z SFK dominuje zůstává neobjasněno.

Studium této problematiky neusnadňuje ani skutečnost, že neznáme, jaký způsobem dochází ke spuštění onemocnění. Například jestli je do tohoto procesu zapojena aktivace konkrétního receptoru či receptorů apod. Rovněž neznáme mechanismus jakým silika, využívaná v této práci, aktivuje inflamazom a další signální dráhy. K lepšímu pochopení zapojení SFK do produkce IL-1 $\beta$  u CMO by bylo potřeba například provést aktivace buněk dalšími stimuly. K úplnému objasnění role SFK a CD45 v rozvoji onemocnění u CMO je tedy potřeba dalšího studia.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem role protein tyrozin fosfatázy CD45 a kináz rodiny Src (SFK) v rozvoji chronické autoinflamatorní osteomyelitidy u myší, která je působena ztrátou exprese adaptorového proteinu PSTPIP2 (CMO myší model). K tomu byl využit CD45 deficientní CMO myší model (CMO CD45KO) a při aktivacích experimentech též inhibitor SFK – PP2.

První část práce se zabývala analýzou a porovnáním zastoupení vybraných typů imunitních buněk v kostní dřeni, slezině a krvi s cílem charakterizovat myší model CMO CD45KO a také určit, jestli je odlišné zastoupení některých typů imunitních buněk u CMO myší závislé na aktivitě CD45, případně způsobeno deregulací SFK.

- U CMO CD45KO bylo pozorováno nízké množství T-lymfocytů. Naproti tomu je zvýšeno množství monocytů ve slezině a množství dendritických buněk ve slezině i kostní dřeni. Tyto fenotypové znaky jsou důsledkem deficiencie CD45.
- CMO CD45KO kopíruje mírně zvýšeným množstvím makrofágů fenotyp CMO. Jedná se tedy o fenotypový znak, který není závislý na aktivitě CD45 ani SFK.
- U CMO CD45KO nedochází k navýšení absolutního počtu granulocytů a monocytů v kostní dřeni tak jako u CMO. Toto navýšení je tedy pravděpodobně závislé na aktivitě CD45 nebo způsobené deregulací SFK.
- Množství CMP a GMP je závislé na aktivitě CD45. Nižší množství GMP u CMO CD45KO může být příčinou nižšího počtu granulocytů v kostní dřeni těchto myší ve srovnání s CMO.

V druhé části diplomové práce byla studována fosforylace SFK v klidovém stavu a po aktivaci silikou. Také byla studována fosforylace MAP kinázy ERK a produkce IL-1 $\beta$ . V obou případech byla sledována závislost deregulace těchto drah u CMO myší na aktivitě SFK.

- Na základě zvýšené fosforylace inhibičního tyrozinu SFK u CMO CD45KO lze u tohoto modelu předpokládat nižší aktivitu SFK než u CMO.



- Celková fosforylace aktivačního tyrozinu se v klidovém stavu a po aktivaci buněk silikou mezi jednotlivými modely příliš neliší. CD45 deficiencie však vede k pozorovatelnému rozdílu v profilu intenzit této fosforylace. Fosforylace středního pásu tohoto profilu je po 30 minutách aktivace silikou u CMO CD45KO výrazně zvýšena ve srovnání s WT. Význam této fosforylace však zůstává neobjasněn.
- U CMO CD45KO nedochází ke zvýšené fosforylaci MAP kinázy ERK jako je tomu u CMO. Je to pravděpodobně v důsledku nižší aktivity SFK.
- U CMO CD45KO nedochází ke zvýšené produkci IL-1 $\beta$  po aktivaci buněk silikou. Zvýšená produkce IL-1 $\beta$  u CMO je tedy závislá na aktivitě CD45 a SFK.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že CD45 a SFK jsou svou aktivitou zapojeny do některých signálních drah, které jsou u CMO deregulované. Jakým způsobem jsou však svou aktivitou do těchto drah zapojeny, zůstává neobjasněno.

## Literatura

- [1] L Byrd, M Grossmann, M Potter, and G L C Shen-Ong. Chronic multifocal osteomyelitis, a new recessive mutation on chromosome 18 of the mouse. *Genomics*, 11(4):794–798, 1991.
- [2] P J Ferguson, X Bing, M A Vasef, L A Ochoa, A Mahgoub, T J Waldschmidt, L T Tygrett, A J Schlueter, and H El-Shanti. A missense mutation in PSTPIP2 is associated with the murine autoinflammatory disorder chronic multifocal osteomyelitis. *Bone*, 38(1):41–47, 2006.
- [3] Y Wu, D Dowbenko, and L A Lasky. PSTPIP2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46):30487–30496, 1998.
- [4] A Drobek, J Kralova, T Skopcova, M Kucova, P Novak, P Angelisova, P Otahal, M Alberich-Jorda, and T Brdicka. PSTPIP2, a protein associated with autoinflammatory disease, interacts with inhibitory enzymes SHIP1 and CSK. *The Journal of Immunology*, 195(7):3416–3426, 2015.
- [5] A Gyorloff-Wingren, M Saxena, S Williams, D Hammi, and T Mustelin. Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. *European journal of immunology*, 29(12):3845–3854, 1999.
- [6] M Okada, S Nada, Y Yamanashi, T Yamamoto, and H C S K Nakagawa. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of Src family kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 266(36):24249–24252, 1991.
- [7] J H Hanke, J P Gardner, R L Dow, P S Changelian, W H Brissette, E J Weringer, B A Pollok, and P A Connelly. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor study of LCK-and FYN T-dependent T cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2):695–701, 1996.
- [8] F Ciccarelli, M De Martinis, and L Ginaldi. An update on autoinflammatory diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 21(3):261–269, 2014.

- [9] A A de Jesus, S W Canna, Y Liu, and R Goldbach-Mansky. Molecular mechanisms in genetically defined autoinflammatory diseases: disorders of amplified danger signaling. *Annual review of immunology*, 33:823–874, 2015.
- [10] C A Wise, J D Gillum, C E Seidman, N M Lindor, R Veile, S Bashiardes, and M Lovett. Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Human molecular genetics*, 11(8):961–969, 2002.
- [11] D R Booth, J D Gillmore, S E Booth, M B Pepys, and P N Hawkins. Pyrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, 91(9):603–606, 1998.
- [12] I Aksentijevich, S L Masters, P J Ferguson, P Dancey, J Frenkel, A van Royen-Kerkhoff, R Laxer, U Tedgaard, E W Cowen, T-H Pham, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *New England Journal of Medicine*, 360(23):2426–2437, 2009.
- [13] S Reddy, S Jia, R Geoffrey, R Lorier, M Suchi, U Broeckel, M J Hessner, and J Verbsky. An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1rN locus. *New England Journal of Medicine*, 360(23):2438–2444, 2009.
- [14] M Sharma and P J Ferguson. Autoinflammatory bone disorders: update on immunologic abnormalities and clues about possible triggers. *Current opinion in rheumatology*, 25(5):658, 2013.
- [15] A J Cox and P J Ferguson. Update on the genetics of nonbacterial osteomyelitis in humans. *Current opinion in rheumatology*, 30(5):521–525, 2018.
- [16] F L Van de Veerdonk, M G Netea, C A Dinarello, and L A B Joosten. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology*, 32(3):110–116, 2011.
- [17] C Coeshott, C Ohnemus, A Pilyavskaya, S Ross, M Wieczorek, H Kroona, A H Leimer, and J Cheronis. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor  $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from a stimulated human monocytic cell line in the presence of

- activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11):6261–6266, 1999.
- [18] U Schonbeck, F Mach, and P Libby. Generation of biologically active IL-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 $\beta$  processing. *The Journal of Immunology*, 161(7):3340–3346, 1998.
- [19] J Maelfait, E Vercammen, S Janssens, P Schotte, M Haegman, S Magez, and R Beyaert. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 $\beta$  maturation by caspase-8. *The Journal of experimental medicine*, 205(9):1967–1973, 2008.
- [20] J Grosse, V Chitu, A Marquardt, P Hanke, C Schmittwolf, L Zeitlmann, P Schropp, B Barth, P Yu, R Paffenholz, et al. Mutation of mouse MAYP/PSTPIP2 causes a macrophage autoinflammatory disease. *Blood*, 107(8):3350–3358, 2006.
- [21] H-J Liao, I-T Chyuan, C-S Wu, S-W Lin, K-H Chen, H-F Tsai, and P-N Hsu. Increased neutrophil infiltration, IL-1 production and a SAPHO syndrome-like phenotype in PSTPIP2-deficient mice. *Rheumatology*, 54(7):1317–1326, 2015.
- [22] V Chitu, P J Ferguson, R De Bruijn, A J Schlueter, L A Ochoa, T J Waldschmidt, Y-G Yeung, and E R Stanley. Primed innate immunity leads to autoinflammatory disease in PSTPIP2-deficient CMO mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(12):2497–2505, 2009.
- [23] T A Hentunen, S J Choi, B F Boyce, M R Dallas, S L Dallas, G L Shen-Ong, and G D Roodman. A murine model of inflammatory bone disease. *Bone*, 26(2):183–188, 2000.
- [24] V Chitu, V Nacu, J F Charles, W M Henne, H T McMahon, S Nandi, H Ketchum, R Harris, M C Nakamura, and E R Stanley. PSTPIP2 deficiency in mice causes osteopenia and increased differentiation of multipotent myeloid precursors into osteoclasts. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(15):3126–3135, 2012.
- [25] J R Lukens, P Gurung, P Vogel, G R Johnson, R A Carter, D J McGoldrick, S R Bandi, C R Calabrese, L V Walle, M Lamkanfi, et al. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. *Nature*, 516(7530):246–249, 2014.

- [26] S L Cassel, J R Janczy, X Bing, S P Wilson, A K Olivier, J E Otero, Y Iwakura, D M Shayakhmetov, A G Bassuk, Y Abu-Amer, et al. Inflammasome-independent IL-1 $\beta$  mediates autoinflammatory disease in PSTPIP2-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3):1072–1077, 2014.
- [27] J R Lukens, J M Gross, C Calabrese, Y Iwakura, M Lamkanfi, P Vogel, and T-D Kanneganti. Critical role for inflammasome-independent IL-1 $\beta$  production in osteomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3):1066–1071, 2014.
- [28] P Gurung, A Burton, and T-D Kanneganti. NLRP3 inflammasome plays a redundant role with caspase 8 to promote IL-1 $\beta$ -mediated osteomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16):4452–4457, 2016.
- [29] X Yu, Y Huang, P Collin-Osdoby, and P Osdoby. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(12):2065–2077, 2004.
- [30] P K K Wong, J M W Quinn, N A Sims, A van Nieuwenhuijze, I K Campbell, and I P Wicks. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 54(1):158–168, 2006.
- [31] J Kralova, A Drobek, J Prochazka, F Spoutil, D Glatzova, S Borna, J Pokorna, T Skopcova, P Angelisova, M Gregor, et al. Regulation of neutrophil NADPH oxidase by PSTPIP2 affects bone damage in murine autoinflammatory osteomyelitis. *BioRxiv*, page 727222, 2019.
- [32] D A Callaway and J X Jiang. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 33(4):359–370, 2015.
- [33] T K Dasari, R Geiger, R Karki, B Banoth, B R Sharma, P Gurung, A Burton, and T-D Kanneganti. The nonreceptor tyrosine kinase SYK induces autoinflammatory osteomyelitis in a mouse model of chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *Journal of Biological Chemistry*, pages jbc-RA119, 2019.

- [34] V Chitu and E R Stanley. Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane–cytoskeletal interactions. *Trends in cell biology*, 17(3):145–156, 2007.
- [35] R H Roberts-Galbraith and K L Gould. Setting the F-BAR: functions and regulation of the F-BAR protein family. *Cell cycle*, 9(20):4091–4097, 2010.
- [36] V Chitu, F J Pixley, F Macaluso, D R Larson, J Condeelis, Y-G Yeung, and E R Stanley. The PCH family member MAYP/PSTPIP2 directly regulates F-actin bundling and enhances filopodia formation and motility in macrophages. *Molecular biology of the cell*, 16(6):2947–2959, 2005.
- [37] R M Thomas, C Schmedt, M Novelli, B K Choi, J Skok, A Tarakhovsky, and J Ro-es. C-terminal SRC kinase controls acute inflammation and granulocyte adhesion. *Immunity*, 20(2):181–191, 2004.
- [38] S M Thomas and J S Brugge. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1):513–609, 1997.
- [39] S J Parsons and J T Parsons. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48):7906–7909, 2004.
- [40] S E Byeon, Y-S Yi, J Oh, B C Yoo, S Hong, and J Y Cho. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of inflammation*, 2012, 2012.
- [41] R Roskoski Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological research*, 94:9–25, 2015.
- [42] M L Hermiston, J Zikherman, and J W Zhu. CD45, CD148, and LYP/PEP: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunological reviews*, 228(1):288–311, 2009.
- [43] G Sun, A K Sharma, and R J A Budde. Autophosphorylation of SRC and YES blocks their inactivation by CSK phosphorylation. *Oncogene*, 17(12):1587–1595, 1998.
- [44] K Nika, C Soldani, M Salek, W Paster, A Gray, R Etzensperger, L Fugger, P Polzella, V Cerundolo, O Dushek, et al. Constitutively active LCK kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity*, 32(6):766–777, 2010.

- [45] T R Hurley, R Hyman, and B M Sefton. Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the LCK, FYN, and c-SRC tyrosine protein kinases. *Molecular and cellular biology*, 13(3):1651–1656, 1993.
- [46] L I Pao and J C Cambier. SYK, but not LYN, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of CD45-B cells. *The Journal of Immunology*, 158(6):2663–2669, 1997.
- [47] J Zikherman, C Jenne, S Watson, K Doan, W Raschke, C C Goodnow, and A Weiss. CD45-CSK phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development. *Immunity*, 32(3):342–354, 2010.
- [48] J Zikherman, K Doan, R Parameswaran, W Raschke, and A Weiss. Quantitative differences in CD45 expression unmask functions for CD45 in B-cell development, tolerance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1):E3–E12, 2012.
- [49] T S P Heng, M W Painter, K Elpek, V Lukacs-Kornek, N Mauermann, S J Turley, D Koller, F S Kim, A J Wagers, N Asinowski, et al. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nature immunology*, 9(10):1091–1094, 2008. Results avable at <http://www.immgen.org/>.
- [50] C A Lowell and G Berton. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases HCK and FGR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13):7580–7584, 1998.
- [51] J W Zhu, K Doan, J Park, A H Chau, H Zhang, C A Lowell, and A Weiss. Receptor-like tyrosine phosphatases CD45 and CD148 have distinct functions in chemoattractant-mediated neutrophil migration and response to *S. aureus*. *Immunity*, 35(5):757–769, 2011.
- [52] P Mazzi, E Cavegion, J A Lapinet-Vera, C A Lowell, and G Berton. The Src-family kinases HCK and FGR regulate early lipopolysaccharide-induced myeloid cell recruitment into the lung and their ability to secrete chemokines. *The Journal of Immunology*, 195(5):2383–2395, 2015.

- [53] M Ernst, M Inglese, G M Scholz, K W Harder, F J Clay, S Bozinovski, P Waring, R Darwiche, T Kay, P Sly, et al. Constitutive activation of the Src family kinase HCK results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response. *The Journal of experimental medicine*, 196(5):589–604, 2002.
- [54] K Abe, A Cox, N Takamatsu, G Velez, R M Laxer, M L Shirley, V B Mahajan, A G Bassuk, H Fuchs, P J Ferguson, et al. Gain-of-function mutations in a member of the Src family kinases cause autoinflammatory bone disease in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(24):11872–11877, 2019.
- [55] K Abe, S Wechs, S Kalaydjiev, T J Franz, D H Busch, H Fuchs, D Soewarto, H Behrendt, S Wagner, T Jakob, et al. Novel lymphocyte-independent mechanisms to initiate inflammatory arthritis via bone marrow-derived cells of Ali18 mutant mice. *Rheumatology*, 47(3):292–300, 2008.
- [56] M Kovacs, T Nemeth, Z Jakus, C Sitaru, E Simon, K Futosi, B Botz, Z Helyes, C A Lowell, and A Mocsai. The Src family kinases HCK, FGR, and LYN are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *Journal of Experimental Medicine*, 211(10):1993–2011, 2014.
- [57] A M Bilwes, J den Hertog, T Hunter, and J P Noel. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- $\alpha$  by dimerization. *Nature*, 382(6591):555–559, 1996.
- [58] M L Hermiston, Z Xu, and A Weiss. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*, 21(1):107–137, 2003.
- [59] J T Pingel and M L Thomas. Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell*, 58(6):1055–1065, 1989.
- [60] C T Weaver, J T Pingel, J O Nelson, and M L Thomas. CD8+ T-cell clones deficient in the expression of the CD45 protein tyrosine phosphatase have impaired responses to T-cell receptor stimuli. *Molecular and cellular biology*, 11(9):4415–4422, 1991.
- [61] K Kishihara, J Penninger, V A Wallace, T M Kundig, K Kawal, A Wakeham, E Timms, K Pfeffer, P S Ohashi, M L Thomas, et al. Normal B lymphocyte development



- but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell*, 74(1):143–156, 1993.
- [62] K F Byth, L A Conroy, S Howlett, A J Smith, J May, D R Alexander, and N Holmes. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+ CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *The Journal of experimental medicine*, 183(4):1707–1718, 1996.
- [63] P J Mee, M Turner, M A Basson, P S Costello, R Zamoyska, and V L J Tybulewicz. Greatly reduced efficiency of both positive and negative selection of thymocytes in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mice. *European journal of immunology*, 29(9):2923–2933, 1999.
- [64] T J Molina, K Kishihara, D P Siderovskid, W Van Ewijk, A Narendran, E Timms, A Wakeham, C J Paige, K-U Hartmann, A Veillette, et al. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56 LCK. *Nature*, 357(6374):161–164, 1992.
- [65] J R Seavitt, L S White, K M Murphy, D Y Loh, R M Perlmutter, and M L Thomas. Expression of the p56 LCK Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development. *Molecular and cellular biology*, 19(6):4200–4208, 1999.
- [66] J W Zhu, T Brdicka, T R Katsumoto, J Lin, and A Weiss. Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling. *Immunity*, 28(2):183–196, 2008.
- [67] M Montoya, R Dawes, D Reid, L N Lee, J Piercy, P Borrow, E Z Tchilian, and P CL Beverley. CD45 is required for type i IFN production by dendritic cells. *European journal of immunology*, 36(8):2150–2158, 2006.
- [68] J Piercy, S Petrova, E Z Tchilian, and P CL Beverley. CD45 negatively regulates tumour necrosis factor and interleukin-6 production in dendritic cells. *Immunology*, 118(2):250–256, 2006.
- [69] T Roach, S Slater, M Koval, L White, E C McFarland, M Okumura, M Thomas, and E Brown. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Current Biology*, 7(6):408–417, 1997.

- [70] J St-Pierre and H L Ostergaard. A role for the protein tyrosine phosphatase CD45 in macrophage adhesion through the regulation of paxillin degradation. *PloS one*, 8(7), 2013.
- [71] S A Berger, T W Mak, and C J Paige. Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells. *The Journal of experimental medicine*, 180(2):471–476, 1994.
- [72] J Irie-Sasaki, T Sasaki, W Matsumoto, A Opavsky, M Cheng, G Welstead, E Griffiths, C Krawczyk, C D Richardson, K Aitken, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409(6818):349–354, 2001.
- [73] M Hagn, S Marschall, and M Hrabe de Angelis. EMMA—the european mouse mutant archive. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 6(3):186–192, 2007.
- [74] L Daulhac, A Kowalski-Chauvel, L Pradayrol, N Vaysse, and C Seva. Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKBreceptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29):20657–20663, 1999.
- [75] I Dikic, G Tokiwa, S Lev, S A Courtneidge, and J Schlessinger. A role for PYK2 and SRC in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, 383(6600):547–550, 1996.
- [76] L M Luttrell, B E Hawes, T van Biesen, D K Luttrell, T J Lansing, and R J Lefkowitz. Role of c-SRC tyrosine kinase in G protein-coupled receptor and  $G\beta\gamma$  subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32):19443–19450, 1996.
- [77] S L Cassel, S C Eisenbarth, S S Iyer, J J Sadler, O R Colegio, L A Tephly, A B Carter, P B Rothman, R A Flavell, and F S Sutterwala. The NALP3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26):9035–9040, 2008.
- [78] D R Stover, P Furet, and N B Lydon. Modulation of the SH2 binding specificity and kinase activity of SRC by tyrosine phosphorylation within its SH2 domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21):12481–12487, 1996.

- [79] J C Williams, A Weijland, S Gonfloni, A Thompson, S A Courtneidge, G Superti-Furga, and R K Wierenga. The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken SRC: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *Journal of molecular biology*, 274(5):757–775, 1997.
- [80] C A Lowell. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Molecular immunology*, 41(6-7):631–643, 2004.
- [81] L Liu, Q Wen, R Gong, L Gilles, M J Stankiewicz, W Li, M Guo, L Li, X Sun, J D Crispino, et al. PSTPIP2 dysregulation contributes to aberrant terminal differentiation in GATA-1-deficient megakaryocytes by activating LYN. *Cell death & disease*, 5(1):e988–e988, 2014.